

*AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEPHROLOGIE
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*UNTERSUCHUNG VON INDUZIERBAREN KOLLAGEN TYP I-KNOCKOUT-MÄUSEN
IM MODELL DER UNILATERALEN URETEROBSTRUKTION*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Hofmarksrichter
aus Schwarzach

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. Matthias Mack</i>
2. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. Hayo Castrop</i>
Tag der mündlichen Prüfung:	07.06.2018

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde angeregt und in ihrer Ausarbeitung überwacht von Prof. Dr. Matthias Mack.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 01.03.2018

Stefanie Hofmarksrichter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Medizinischer Hintergrund der Nierenfibrose.....	6
1.2	Anatomischer Aufbau und Funktionsweise der Niere.....	7
1.3	Struktur, Biosynthese und Abbau von Kollagen	8
1.4	Kollagen-produzierende Zellen und ihre Vorläuferzellen in der geschädigten Niere.....	10
1.4.1	Myofibroblasten	10
1.4.2	Fibroblasten	11
1.4.3	Fibrozyten.....	12
1.4.4	Perizyten.....	13
1.4.5	Epitheliale Tubuluszellen.....	13
1.4.6	Endothelzellen	14
1.5	Die unilaterale Ureterobstruktion als Modell der Nierenfibrose	15
1.6	Ubiquitärer konditioneller Knockout von Kollagen Typ I	17
1.6.1	Cre/loxP-System.....	17
1.6.2	ERT2-Cre-System	18
1.6.3	Kollagen Typ I / loxP-Sequenz	18
1.7	Zielsetzung.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.2	Methoden	28
2.2.1	Induktion des konditionellen Knockouts.....	28
2.2.2	Unilaterale Ureterobstruktion.....	29
2.2.3	Genotypisierung der Versuchstiere	31
2.2.4	Analyse genomischer DNA.....	36
2.2.5	Analyse von messenger RNA (mRNA)	37
2.2.6	Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	40
2.2.7	Histologie	43
2.2.8	Immunhistologie.....	48
2.2.9	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Intraperitoneale Applikation von Tamoxifen	51
3.2	Applikation von Tamoxifen über Medizinalfutter.....	60

3.2.1	Tamoxifenapplikation über Medizinalfutter im 4+1-Wochenschema	60
3.2.2	Tamoxifenapplikation über Medizinalfutter im 5+2-Wochenschema	73
3.3	Einflussfaktoren auf den induzierten Kollagen-Knockout	84
3.3.1	Dauer der Tamoxifengabe	84
3.3.2	Alter der Versuchstiere.....	85
3.3.3	Cre/Flox-Ratio aus der Genotypisierung von Schwanzbiopsien.....	87
3.4	Beobachtungen zu den gesundheitlichen Auswirkungen des induzierten Knockouts 88	
4	Diskussion.....	90
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literatur.....	102

1 Einleitung

1.1 Medizinischer Hintergrund der Nierenfibrose

Mit einer Prävalenz von etwa 10% in der erwachsenen Bevölkerung stellen chronische Nierenerkrankungen ein sehr häufiges Krankheitsbild dar. Weltweit sind ca. 2 Millionen Menschen sogar dauerhaft dialysepflichtig, wobei diese Zahl nicht einmal die vielen Patienten einschließt, die zwar hochgradig niereninsuffizient wären, aber aufgrund fehlender Kapazitäten vor allem in Entwicklungsländern keinen Zugang zu Dialysegeräten haben. Gleichzeitig steigt die Zahl der Patienten mit chronischer Nierenerkrankung weiterhin an, sowohl durch die in ihrer Prävalenz zunehmenden zugrunde liegenden Grunderkrankungen wie arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus, als auch durch das Erreichen eines höheren Lebensalters aufgrund besserer medizinischer Versorgung (1).

Definiert wird die chronische Nierenerkrankung laut KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) als eine länger als 3 Monate anhaltende Beeinträchtigung der Niere, die sich entweder in einem strukturellen oder funktionellen Schaden der Niere oder in einer Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60ml/min/1,73m^2 äußert. Je nach GFR der Patienten wird die chronische Nierenerkrankung in 5 Stadien eingeteilt, beginnend bei normaler Nierenfunktion bis hin zum Nierenversagen bei einer GFR von unter 15ml/min/1,73m^2 . Strukturelle und funktionelle Schäden der Nieren äußern sich beispielsweise in einer Albuminurie bzw. Proteinurie (2).

Die Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung sind vielfältig und reichen vom bereits aufgeführten Bluthochdruck sowie Diabetes mellitus über entzündliche und autoimmun-entzündliche Krankheiten bis hin zu Blasensteinen oder Neoplasien des Urogenitaltraktes (2). Das Endstadium aller derartigen Erkrankungen zeichnet sich stets durch das typische Bild eines im Sinne einer Nierenfibrose pathologisch veränderten Organs aus.

Die Fibrose ist der Endzustand eines meist langwierigen Krankheitsverlaufes, in dessen Zuge durch ständig oder intermittierend einwirkende Noxen unterschiedlicher Art Entzündungsprozesse in Gang gesetzt und aufrecht erhalten werden. Diese führen zu einer Sklerosierung von Glomeruli und Blutgefäßen (3). Darüber hinaus kommt es aufgrund von Atrophie und Apoptose zu einem Verlust von Tubuluszellmasse. Das Tubulointerstitium, das dadurch mehr Raum einnimmt, wird von Extrazellulärmatrix (EZM) -produzierenden Zellen mit fibrotischem Narbengewebe, d. h. mit verschiedenen Kollagenen (v. a. Typ I, III, IV und VII), Fibronektin, Laminin und anderen Proteinen aufgefüllt (4). Die überproportionale

Ablagerung von Kollagen lässt das Organ dabei deutlich an Elastizität und Flexibilität verlieren (5).

Da also in der erkrankten Niere durch chronische Schädigung die organtypischen Strukturen teilweise verloren gehen, kann das Organ im pathologischen, fibrotischen Zustand seine Funktionen, die im folgenden Punkt näher beschrieben werden, nicht länger adäquat erfüllen.

1.2 Anatomischer Aufbau und Funktionsweise der Niere

Die Aufgaben der Niere sind vielfältig. Sie bestehen in erster Linie darin, Blut zu filtern und von wasserlöslichen ausscheidungspflichtigen Substanzen zu reinigen, den Blutdruck sowie den Wasser-, Salz- und Säure-/Basehaushalt mittel- und langfristig zu regulieren und Hormone wie etwa Erythropoietin, Calcitriol und Prostaglandine zu bilden (6).

Die Niere liegt als paariges Organ im Retroperitonealraum. Sie wird umgeben von einer eng anliegenden bindegewebigen Nierenkapsel, einer stützenden Fettgewebsschicht und der Nierenfaszie. Am medial gelegenen Nierenhilus mündet die *Arteria renalis* in die Niere, und dort verlassen auch die *Vena renalis* und der Ureter das Organ (siehe Abb. 1.1a) (7).

Das Parenchym der Niere unterteilt sich in die Rinde, wo die Nierenkörperchen und Teile des Tubulussystems lokalisiert sind, und das in Pyramiden gegliederte Mark mit den übrigen Anteilen des Tubulussystems und den Sammelrohren.

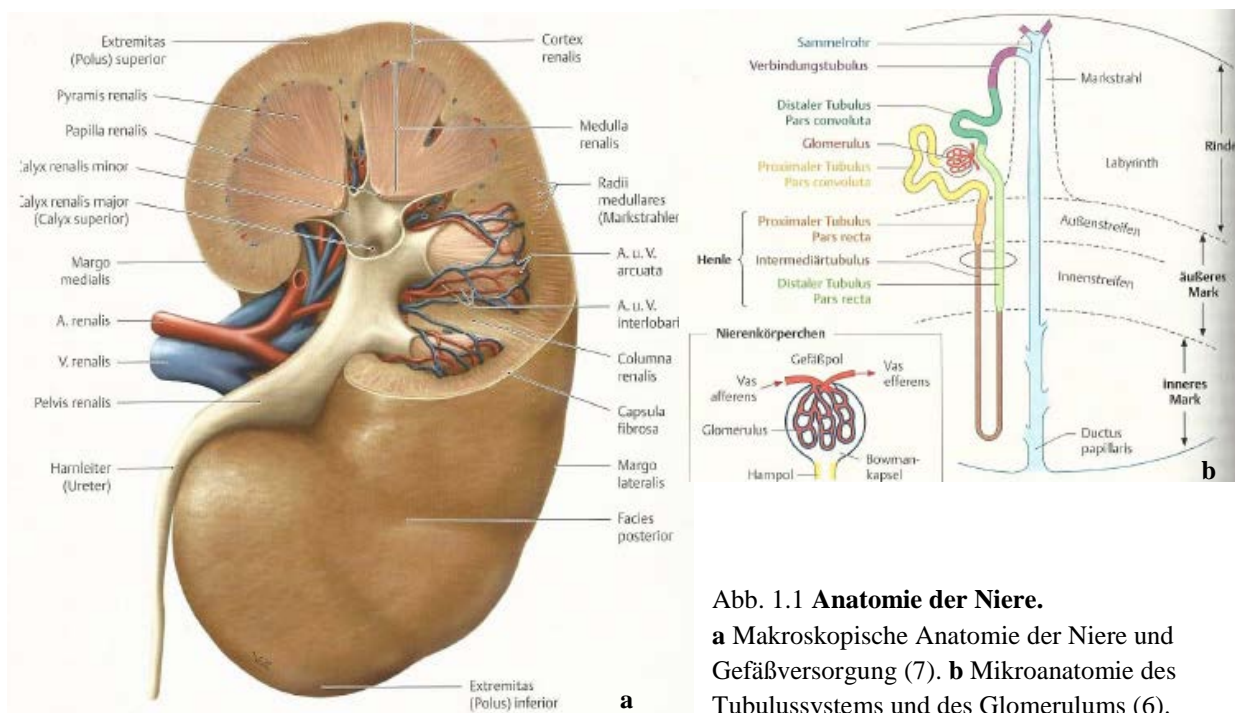


Abb. 1.1 Anatomie der Niere.

a Makroskopische Anatomie der Niere und Gefäßversorgung (7). **b** Mikroanatomie des Tubulussystems und des Glomerulums (6).

Die Nierenarterie zweigt sich auf ihrem Weg zur Nierenrinde und innerhalb der Rinde mehrmals auf, um schließlich als *Aa. arcuatae radiatae* Richtung Mark zu ziehen. Von den *Aa. arcuatae radiatae* gehen die *Vasa afferentia* ab, die wiederum in die Kapillarschlingen der Glomeruli übergehen. Die glomerulären Kapillaren liegen eingebettet im bindegewebigen Mesangium. Die postkapillären *Vasa efferentia* ziehen sodann radiär ins Mark hinunter. Dem medullären Kapillargebiet nachgeschaltet, führen venöse Gefäße parallel zu arteriellen Gefäßen zurück zum Nierenhilus, wo die *V. renalis* das Organ verlässt (7).

Im Nierenkörperchen wird das Blut gefiltert. Wasser, Salze und weitere kleine Moleküle können durch die Filtrationsbarriere bestehend aus Kapillarendothel, Basalmembran und einem Geflecht aus Podozytenfortsätzen in den Bowman'schen Kapselraum penetrieren. Moleküle, die größer als 4,4nm sind, können die Barriere kaum noch passieren, positiv oder neutral geladene Teilchen werden leichter filtriert als negativ geladene Moleküle. Das Filtrat fließt in das unverzweigte Tubulussystem, das aus proximalem Tubulus, Henleschleife und distalem Tubulus besteht (s. Abb. 1.1b). In den Tubuli werden Wasser, Salze und Proteine resorbiert, und der Harn wird konzentriert. Jeweils mehrere Tubuli münden über Verbindungsstücke in Sammelrohre, aus denen der Harn im Bereich der Markpapille in das Nierenbecken abfließt. Von dort wird er über den Ureter zur Harnblase geleitet und ausgeschieden (6).

Wie bereits erwähnt, gehen diese Funktionen und Strukturen im Falle einer sich entwickelnden Nierenfibrose nach und nach verloren. Im Rahmen des bindegewebigen Organumbaus nimmt eines der vielen Strukturproteine, die sich im Gewebe ablagern, eine dominierende Stellung ein, nämlich Kollagen.

1.3 Struktur, Biosynthese und Abbau von Kollagen

Kollagen stellt das am häufigsten im Körper vorkommende Strukturprotein dar und ist in den meisten Gewebearten und Organen zu finden. Es gibt mindestens 25 verschiedene Kollagentypen, die jeweils von separaten Genen kodiert werden. Kollagen Typ I ist unter anderem ein wesentlicher Bestandteil von lockerem Bindegewebe, Sehnen, Bändern und Knochen. Kollagen Typ II kommt vor allem in hyalinem Knorpel vor, Typ III in viszerale Organen und Typ IV in Basalmembranen (7), um nur die wichtigsten Vertreter zu nennen. In denjenigen Zellen, die Kollagen produzieren, wird die entsprechende DNA-Sequenz zunächst in mRNA transkribiert. Die mRNA wird prozessiert und von Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum translatiert, sodass die entstehende Polypeptidkette ins Lumen

des endoplasmatischen Retikulums gelangt. Sie besteht aus sich wiederholenden Aminosäuretripletts, an deren erster Stelle Glycin steht, an zweiter Stelle meistens Prolin und an dritter Stelle Prolin oder Lysin. Im Golgi-Apparat wird ein Teil der Proline und Lysine zu Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin hydroxyliert. Zusätzlich werden manche Hydroxylysine glykosyliert.

Die Polypeptidkette windet sich zur linksgängigen Kollagen- α -Helix. Drei dieser α -Helices (zwei α_1 - und eine α_2 -Kette bei Kollagen Typ I) lagern sich zu einer Tripelhelix zusammen, die über Wasserstoffbrücken zusammen gehalten wird. Dieses Prokollagenmolekül wird in den Extrazellulärraum sezerniert, wo endständige Propeptide abgespalten werden (s. Abb. 1.2a) (8). Die auf diese Weise entstandenen Tropokollagenmoleküle lagern sich in streng geordneter Weise zu dicht gepackten Kollagenfibrillen aneinander (s. Abb. 1.2b). Solche Fibrillen sind überaus zugfest, besitzen durch ihren welligen Verlauf aber zugleich eine gewisse Dehnungsreserve (6).

Neben Kollagen besteht die EZM aus zahlreichen weiteren Proteinen, Proteoglykanen und Glucosaminoglykanen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Manche dieser Moleküle sind eng mit Kollagen assoziiert, wie zum Beispiel Fibronectin. Dieses ist ein dimeres Protein, das

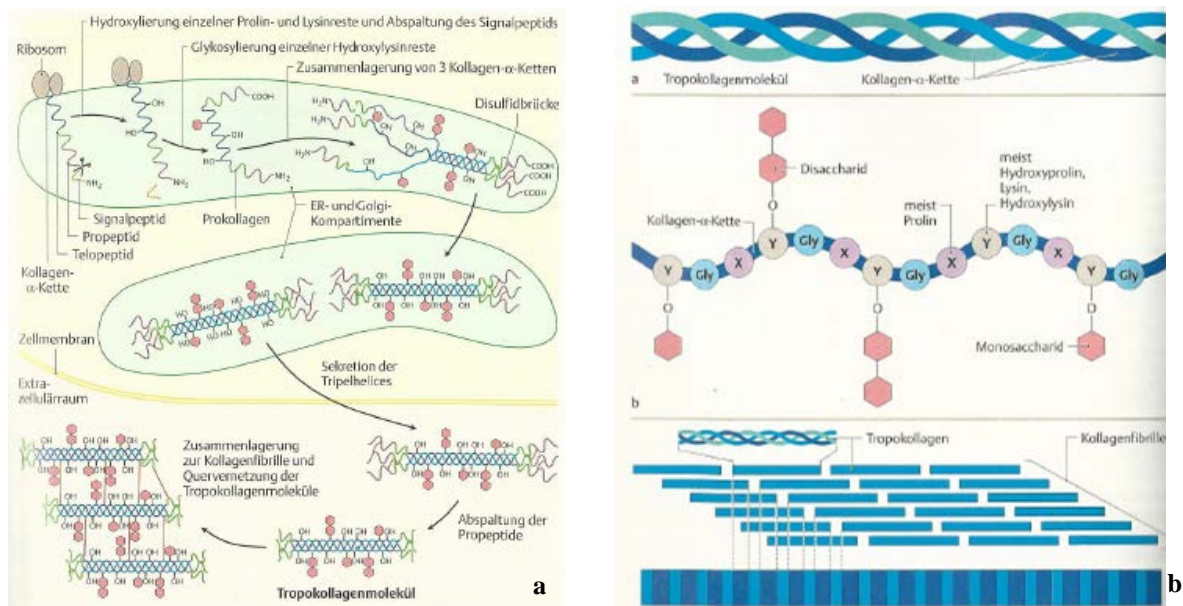


Abb. 1.2 **Biosynthese und Molekularstruktur von Kollagen.** **a** Die Kollagen-mRNA wird in das endoplasmatische Retikulum hinein translatiert. Die Polypeptidketten werden im Golgi-Apparat hydroxyliert und glykosyliert. Je drei von ihnen lagern sich zum tripelhelikalen Prokollagenmolekül zusammen, welches in den Extrazellulärraum transportiert wird. Nach der Abspaltung endständiger Peptide lagern sich die Moleküle zu Kollagenfibrillen zusammen (8). **b** Zu sehen sind die tripelhelikale Struktur der Kollagenmoleküle, die Abfolge der Aminosäuren und die streng geordnete Weise, in der sich die Tropokollagenmoleküle extrazellulär zu Kollagenfibrillen zusammenlagern. Durch die strenge Anordnung entsteht die typischerweise unter dem Elektronenmikroskop sichtbare Querstreifung der Kollagenfasern (8).

sowohl an Kollagen als auch an Integrine auf Zelloberflächen binden kann und dadurch eine Verbindung zwischen Zelle und EZM herstellt (8). Es erfüllt somit eine wichtige Funktion für die Verankerung von Kollagen und könnte sogar eine regulierende Wirkung auf die Expression von Kollagen haben (5).

Die EZM ist einem steten Umbau und ständiger Erneuerung unterworfen. Den dafür nötigen Abbau der Strukturmoleküle übernehmen sogenannte Matrix-Metalloproteasen. Diese Enzyme zeichnen sich durch ein Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum aus. Sie können gebunden an Zelloberflächen oder auch frei in der EZM vorkommen. Bisher wurden über 20 verschiedene Matrix-Metalloproteasen identifiziert, die in Gruppen eingeteilt werden, zu denen auch die Gruppe der Kollagenasen gehört. Kollagenasen schneiden Kollagene an einer spezifischen Stelle in ihrer Aminosäuresequenz, sodass das entstandene Teilstück mit dem N-Terminus etwa drei Viertel der ursprünglichen Länge und das Stück mit dem C-Terminus etwa ein Viertel der Länge hat. Gelatinasen verdauen denaturierte Kollagene, und auch viele weitere Metalloproteasen besitzen die Fähigkeit zum Abbau von Kollagen. Reguliert werden die Matrix-Metalloproteasen durch Metalloprotease-Inhibitoren, die sich in das katalytische Zentrum der Proteasen einlagern und die Bindestelle für die eigentlichen Substrate blockieren (9).

Die Gestaltung der EZM und insbesondere die Synthese von Kollagen wird allerdings nicht von allen, sondern vornehmlich von darauf spezialisierten Zelltypen vorgenommen, die im Folgenden, mit Fokus auf die Situation in der fibrosierenden Niere, vorgestellt werden.

1.4 Kollagen-produzierende Zellen und ihre Vorläuferzellen in der geschädigten Niere

1.4.1 Myofibroblasten

Myofibroblasten sind aktivierte, vollständig differenzierte Zellen, die in einem geschädigten Organ vermehrt EZM bilden. Sie sind hauptverantwortlich für die übermäßige Ablagerung von Kollagen und anderen Matrixproteinen. Unter normalen Umständen kommen sie kaum im Gewebe vor, bei akuter Schädigung aber steigen ihre Zahl und Aktivität stark an (5).

Phänotypisch zeichnen sie sich einerseits durch ihre Ähnlichkeit zu Fibroblasten aus. Des Weiteren weisen sie reichlich raues endoplasmatisches Retikulum, die Fähigkeit zur Kontraktion und die Expression von α -SMA (α -smooth muscle actin), welches typischerweise in glatten Muskelzellen vorkommt, auf (10).

Nach der klassischen Theorie zur Herkunft der Myofibroblasten differenzieren sie sich im Falle einer Gewebeschädigung und der darauf folgenden Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus ortsständigen Fibroblasten. Bedeutende Entzündungsmediatoren sind zum Beispiel TGF- β (Transforming growth factor β), CTGF (Connective tissue growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), IL-1 (Interleukin-1) und Angiotensin II (11).

Durch weitere Forschung auf diesem Gebiet zeigte sich jedoch, dass dies nicht der einzige Weg ist, auf dem Myofibroblasten entstehen können. Abgesehen von den Fibroblasten gibt es weitere Vorläuferzellen (vgl. Abb. 1.3) (10), die ebenfalls kurz beschrieben werden sollen.

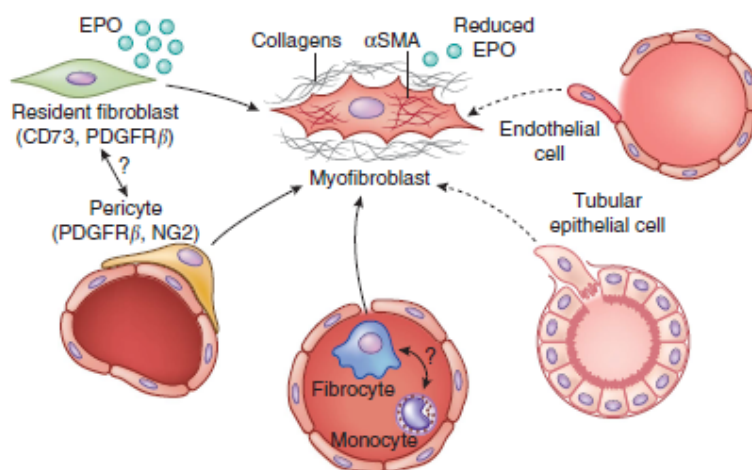


Abb. 1.3 **Kollagen-produzierende Myofibroblasten und ihre Vorläuferzellen.** Sowohl ortsständige Fibroblasten als auch Fibroblasten-ähnliche Perizyten und Fibrozyten hämatopoietischen Ursprungs können im Zuge einer Fibrose zu Myofibroblasten differenzieren und Kollagene produzieren. Auch epitheliale Tubuluszellen und endotheliale Zellen können wohl zu Myofibroblasten differenzieren (10).

1.4.2 Fibroblasten

Fibroblasten sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, deren Aufgabe im Wesentlichen die Produktion und Regulierung von EZM ist. Morphologisch weisen sie eine längliche Zellform mit einem spindelförmigen Kern auf. Sie kommen nicht nur in Bindegewebe, Sehnen und Haut vor, sondern auch in viszerale Organen. In der Niere sind sie im Interstitium, dem Zwischenraum zwischen Tubuli und Blutgefäßen, zu finden. Allerdings sind sie dort nicht sehr zahlreich anzutreffen und bilden im Normalfall eher spärlich EZM (6).

Die Identifizierung von Fibroblasten mittels spezifischer Marker gestaltet sich schwierig, da es keinen typischen Marker gibt, der nur von Fibroblasten exprimiert wird. In der Regel müssen mehrere Marker kombiniert werden, um Fibroblasten zu identifizieren. Fibroblasten sind beispielsweise positiv für PDGFR- β (Platelet-derived growth factor receptor β), CD73

(10) und das Intermediärfilament Vimentin, jedoch negativ für Desmin und nur schwach positiv für α -SMA (11).

Die embryonale Herkunft renaler Fibroblasten ist nicht gänzlich geklärt. Anteile der Population könnten aus dem metanephrischen Mesenchym oder dem intermediären Mesoderm stammen (10), von Zellen aus dem Knochenmark abstammen (11) oder aus der Neuralleiste einwandern (10).

Manche Fibroblasten des Nierenkortex und des äußeren Markes haben neben den für sie üblichen Aufgaben auch die Fähigkeit, Erythropoietin zu produzieren, und sind daher essentiell für eine ausreichende Produktion von roten Blutkörperchen (10).

Im Falle einer Entzündung können Fibroblasten auf verschiedene Mediatoren aus den Familien der Interleukine (z. B. IL-6 und IL-13), Prostaglandine und Leukotriene (5) sowie auf mechanische Zugkräfte (11) reagieren und zu einer Myofibroblastendifferenzierung angeregt werden. Sie sind auch in der Lage, selbst Zytokine, Chemokine und Wachstumshormone zu produzieren, durch die beispielsweise Immunzellen in das geschädigte Gewebe migrieren können. Im Zuge des Wundheilungsprozesses schaffen Fibroblasten darüber hinaus durch die Synthese einer geeigneten EZM und die Förderung der VEGF (Vascular endothelial growth factor) -Ausschüttung die Voraussetzungen für die Bildung neuer Blutgefäße, die das Gewebe versorgen (5).

1.4.3 Fibrozyten

Als Fibrozyten werden Zellen beschrieben, die hämatopoietischen Ursprungs sind und Kollagen synthetisieren. Demzufolge sind Fibrozyten positiv für hämatopoietische Oberflächenmarker wie CD45, CD11b und CD34 und exprimieren zugleich Kollagen bzw. intrazelluläres Prokollagen (10).

Aus welchen Vorläuferzellen sich Fibrozyten konkret entwickeln, ist noch nicht abschließend geklärt. Die durch *in vitro*-Versuche entstandene Theorie, sie würden aus Monozyten reifen, ließ sich in Versuchen mit Monozyten-depletierten Mäusen nicht bestätigen. Fibrozyten scheinen sich vielmehr im Knochenmark ganz oder teilweise zu differenzieren und dann über die Blutbahn in ein geschädigtes Organ zu infiltrieren, anstatt sich erst vor Ort aus Vorläuferzellen zu differenzieren (12).

Dabei scheinen für die Entwicklung der Fibrozyten und deren Anregung zur Kollagenproduktion vor allem CD4⁺ T-Zellen wichtig zu sein, ebenso wie bestimmte Zytokine, z. B.

TGF- β , Endothelin-1 und IL-13. Andere Interleukine sowie TNF- α (Tumor-Nekrosefaktor- α) und Interferon- γ hemmen dagegen die Fibrozytenentwicklung (10).

1.4.4 Perizyten

Perizyten sind stark verzweigte, kontraktile Zellen mesenchymalen Ursprungs, die zumindest teilweise in die Basalmembran von Kapillaren oder unmittelbar prä- oder postkapillären Gefäßen eingebettet sind und durch die Produktion von Kollagenen und Lamininen auch zu deren Aufbau beitragen. Sie umhüllen die Mikrogefäße mit Unterbrechungen, können deren Lumenweite regulieren und bilden enge Kontakte zu den Endothelzellen aus (13).

Perizyten exprimieren unter anderem die Marker PDGFR- β und NG2 und teilen viele weitere Marker mit Fibroblasten, sodass ihre Identifizierung eher schwierig ist und vor allem durch ihre enge Beziehung zu Endothelzellen gesichert werden kann (10).

Die Herkunft der Perizyten scheint vielfältig und organabhängig zu sein. Als Herkunftsorte werden in der Literatur die Neuralleiste, die Somiten (10) oder lokales Mesenchym (13) genannt.

Im Falle einer Organschädigung, die eine Fibrose nach sich zieht, sind Perizyten in der Lage, sich von den Endothelzellen abzulösen, tiefer in den interstitiellen Raum hinein zu wandern, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren und EZM einschließlich Kollagen Typ I zu bilden. Für die Mikrogefäße hat dieses Verhalten jedoch verheerende Folgen. Die Abwesenheit von Perizyten destabilisiert die Kapillaren, sodass deren Dichte abnimmt. Somit tragen sowohl die verringerte Kapillardichte als auch die Anhäufung von Narbengewebe zu einer Verschlechterung der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff bei (10).

1.4.5 Epitheliale Tubuluszellen

Das Tubulussystem der Niere wird von einschichtigem Epithel ausgekleidet, dessen Morphologie sich von Tubulusabschnitt zu Tubulusabschnitt leicht unterscheidet. Unter physiologischen Umständen fällt den Tubulusepithelzellen die Aufgabe zu, Glucose, Proteine, Salze, Wasser und andere aus dem Blut filtrierte Mikromoleküle aus dem Primärharn zu resorbieren. Zugleich sezernieren sie bestimmte ausscheidungspflichtige Substanzen und erhalten eine dichte Barriere zwischen Tubuluslumen und Interstitium aufrecht (6).

Werden die Tubuluszellen geschädigt, so können sie Chemokine und Zytokine, z. B. IL-1 und IL-6, ausschütten und dadurch sowohl Entzündungszellen anlocken als auch bei länger

anhaltender Schädigung den Fibroseprozess in Gang setzen. Ob die Tubuluszellen jedoch direkt an der Fibrose teilhaben, indem sie zu Myofibroblasten differenzieren und Kollagen produzieren, ist noch unklar und aufgrund verschiedener Versuchsergebnisse umstritten (10).

Voraussetzung für die Differenzierung in Myofibroblasten ist die sogenannte Epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die EMT beschreibt einen Prozess, bei dem vollständig differenzierte Epithelzellen ihre epithelialen Merkmale, wie etwa ihre typische Zellpolarität und ihre Kontaktstrukturen zu anderen Zellen, verlieren. Stattdessen nehmen sie mesenchymale Merkmale an, wie die Fähigkeit zur Kontraktion und zur Migration durch die EZM. EMT findet physiologischerweise während der Embryogenese statt (14).

Ob die Fähigkeit zur EMT bei einer Organschädigung reaktiviert werden kann, ist unklar. Bei *in vitro*-Versuchen konnte zwar beobachtet werden, dass proximale Tubuluszellen unter der Stimulation mit TGF- β 1 die Fibroblasten- bzw. Myofibroblasten-typischen Marker FSP-1 (fibroblast secretory protein-1) und α -SMA zu exprimieren begannen, bei *in vivo*-Versuchen konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden (13), sodass die Sachlage bislang ungeklärt bleibt.

1.4.6 Endothelzellen

Endothelzellen sind sehr flache Zellen, die Blutgefäße auskleiden (6). Es existiert die Theorie, dass sie sich in einem Prozess ähnlich der EMT zu mesenchymalen Zellen umdifferenzieren können, um ebenfalls zur Ablagerung von EZM beizutragen. Dies wird als Endothelial-mesenchymale Transition (EndoMT) bezeichnet.

EndoMT spielt eine wichtige Rolle für die embryonale Entwicklung der Herzklappen und scheint auch einen Beitrag zur Fibrose im Herzen zu leisten. Versuche mit Mäusen, die Cre unter dem Promotor für *Tie2*, einem Endothelzellmarker, exprimieren und deren Genom EGFP (enhanced green fluorescent protein) in Verbindung mit einer mit loxP-Stellen versehenen vorgeschalteten STOP-Kassette enthält, legten zudem die Vermutung nahe, dass EndoMT auch in der geschädigten Niere von gewisser Bedeutung sein könnte (15).

1.5 Die unilaterale Ureterobstruktion als Modell der Nierenfibrose

Um die Pathophysiologie der Nierenfibrose untersuchen zu können, werden u. a. verschiedene Mausmodelle eingesetzt. Für die vorliegende Arbeit wurde die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) als Modell der Nierenfibrose in der Maus genutzt.

Die UUO stellt eine etablierte Methode dar, um in Versuchstieren in relativ kurzer Zeit eine Fibrose der Niere hervorzurufen. Verglichen mit anderen Methoden, die Fibrose-induzierende Toxine nutzen, bietet sie einige Vorteile. Die UUO ist technisch relativ leicht durchführbar und führt zu gut reproduzierbaren Ergebnissen. Dadurch, dass die kontralaterale Niere unangetastet und in ihrer Funktion intakt bleibt, wird der Stoffwechsel des Versuchstieres kaum durch die mangelnde Nierenfunktion beeinträchtigt, sodass weder Urämie noch Toxine zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse führen. Die kontralaterale Niere kann zudem, auch wenn sie aufgrund der unvermittelt erhöhten Belastung leichte funktionelle und strukturelle Veränderungen aufweist, als interne Kontrolle verwendet werden (16).

Durchgeführt wird die UUO mittels einer kurzen Operation, in deren Verlauf einer der beiden Ureteren des Versuchstieres ligiert wird, sodass ipsilateral kein Harn mehr zur Blase passieren kann. Aufgrund des sich ausbildenden Harnstaus stellt sich eine ganze Reihe von metabolischen und strukturellen Veränderungen in der vorgeschalteten Niere ein.

Im Detail wird durch den sich stauenden Harn das Tubulussystem der Niere mechanisch gedehnt und aufgeweitet. Der Druck in der Bowman'schen Kapsel steigt an. Zwar wird die Niere unmittelbar nach der UUO stärker durchblutet, doch schon wenig später werden Mediatoren ausgeschüttet, z. B. Angiotensin II und Thromboxan A₂, die zu einer Vasokonstriktion und damit zu einem erniedrigten Druck in den Kapillarschlingen der Glomeruli führen. Somit sinkt die GFR rasch ab (17).

Die Epithelzellen der dilatierten Tubuli nehmen durch den mechanischen und den ischämisch-hypoxischen Stress strukturellen und funktionellen Schaden. Es kommt zum Verlust von typischen morphologischen Aspekten, zu Apoptose und zur Atrophie der Tubuluszellen (16, 17).

Obwohl der Harnstau vor allem das Tubulussystem belastet, weisen sekundär auch die Glomeruli leichte, eher unspezifische Schädigungen wie etwa kollabierende Kapillarlumina auf (17).

Parallel zu den genannten Auswirkungen des Harnstaus, die den veränderten Druckverhältnissen geschuldet sind, bildet sich bereits unmittelbar nach der UUO eine interstitielle Entzündung in der Niere aus. Die gestressten Tubuluszellen schütten Chemokine aus, reaktive Sauerstoffspezies werden gebildet, und das Renin-Angiotensin-System wird

aktiviert (16, 17). Die Chemokine und Angiotensin II locken Entzündungszellen an (17, 18). Vor allem Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten wandern aus den Blutgefäßen in den interstitiellen Raum der Niere ein. Auch sie produzieren Zytokine und Chemokine, die die Entzündung vorantreiben und weitere Zellen infiltrieren lassen (17). Geschädigte Tubuluszellen werden von ihnen, beispielsweise über TNF- α , in die Apoptose getrieben und abgeräumt (16).

Zugleich proliferieren und differenzieren, ebenfalls unter der Kontrolle von Zytokinen und Chemokinen, unterschiedliche Zelltypen zu Myofibroblasten (s. Kap. 1.4). Sie bilden vermehrt Kollagen, Fibronectin und andere Bestandteile der EZM. Hervorzuheben ist die Rolle, die TGF- β in diesem Zusammenhang spielt. TGF- β ist ein Protein, das gebunden an LAP (Latency-associated peptide) in die EZM eingebaut wird und dort zunächst inaktiv ist. Beispielsweise durch Angiotensin II kann TGF- β aktiviert werden. Es bindet an seinen zugehörigen Rezeptor und stößt eine Smad-Signaltransduktionskaskade an. Ein Komplex aus Smad2, Smad3 und Smad4 kann in den Zellkern übertreten und dort Fibrose-assoziierte Gene wie die Gene für Kollagen Typ I und Fibronectin aktivieren. Zusätzlich inhibiert TGF- β Matrix-Metalloproteasen, die die EZM wieder abbauen würden, und fördert im Gegenzug die Synthese von Metalloprotease-Inhibitoren. Darüber hinaus induziert TGF- β die Bildung von CTGF, welcher seinerseits eine wichtige Rolle für die Proliferation von Fibroblasten und die Ablagerung von EZM hat (18).

Dies stellt jedoch nur einen kleinen Teil der Prozesse dar, die sich bei einer akuten Schädigung der Niere abspielen. Etliche Zelltypen, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren beteiligen sich an den komplexen Regelkreisen infolge einer UUO oder einer anderen akuten oder chronischen Noxe (17).

In diesem Zusammenhang ist von besonderer Relevanz auch die Frage, welche Rolle Kollagen, vor allem Kollagen Typ I, in diesem pathogenetischen Prozess der Nierenfibrose spielt und welche Bedeutung die Ablagerung von Kollagen Typ I für den Erhalt der Nierenfunktion hat. Ein Knockout-Modell für Kollagen Typ I in der Maus kann in diesem Zusammenhang für weiteren Erkenntnisgewinn sorgen. Da jedoch der vollständige Knockout von Kollagen Typ I embryonal letal ist (19), wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem konditionellen Knockout in Mäusen gearbeitet, der nachfolgend erläutert wird.

1.6 Ubiquitärer konditioneller Knockout von Kollagen Typ I

1.6.1 Cre/loxP-System

Klassische genetische Knockouts bestimmter Gene werden in Mäusen bereits seit längerer Zeit genutzt, um die Funktion dieser Gene genauer zu analysieren oder auch Modelle für Erkrankungen beim Menschen zu erstellen (20). Da das betroffene Gen dem Organismus komplett und zu jedem Zeitpunkt fehlt, stößt das System jedoch schnell an seine Grenzen. Viele Gene sind bereits im Verlauf der embryonalen Entwicklung unabdingbar, sodass die entsprechenden Knockout-Tiere schon intrauterin oder bald nach der Geburt versterben, noch bevor sie für Versuche zur Verfügung stehen (21).

Um auch derartige Gene untersuchen zu können, bieten sich induzierbare Knockout-Systeme an, welche zum Beispiel das Cre/loxP-System nutzen.

Cre ist ursprünglich eine 38kDa große Rekombinase aus dem P1 Bakteriophagen. LoxP ist die zugehörige DNA-Sequenz für Cre. Sie besteht aus zwei je 13 Basenpaare (bp) langen Palindromsequenzen, die eine 8bp lange Spacer-Sequenz umschließen. Damit Cre eine Rekombination im Genom bewirken kann, müssen mindestens zwei loxP-Stellen darin vorkommen. An den insgesamt vier Palindromabschnitten bindet dann je ein Cre-Molekül. Die vier Cre-Moleküle schließen sich zu einem Tetramer zusammen, stellen somit eine Verbindung zwischen den beiden loxP-Sequenzen her und schneiden die DNA im Bereich der Spacer-Sequenzen. Je nach Lage und Orientierung der loxP-Sequenzen kann die Rekombination in einer Exzision, einer Inversion oder einer Translokation der Gen-Sequenz bestehen (22) (s. Abb. 1.4).

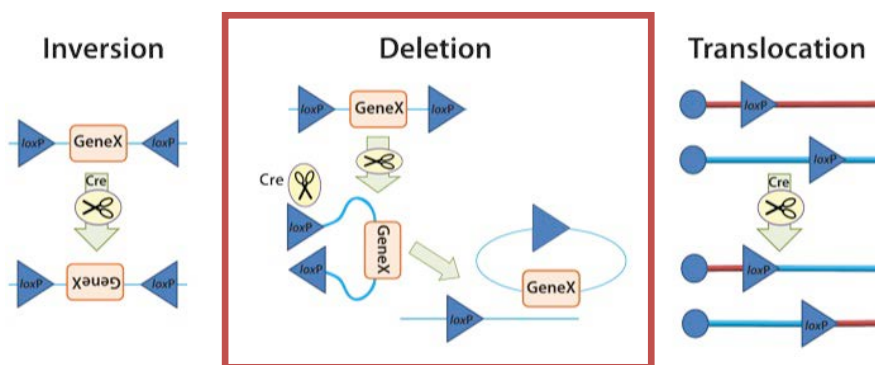


Abb. 1.4 **Genetische Rekombination *in vivo* mit dem Cre/loxP-System.**

Mittels der Rekombinase Cre kann ein Genabschnitt je nach Orientierung der loxP-Sequenzen invertiert, deletiert oder transloziert werden. (modifiziert nach <http://cdn2.hubspot.net/hub/306096/file-2314397959-jpg/CRE.jpg>)

Um einen Knockout zu erreichen, sollten die beiden loxP-Sequenzen das komplette gewünschte Gen oder zumindest einen funktional wichtigen Teil des Gens umschließen, sodass das Gen nach der Rekombination nicht mehr zu einem funktionsfähigen Protein transkribiert und translatiert wird. Die Einbringung der loxP-Sequenzen ins Genom sollte die Expression des Zielgens oder benachbarter Gene nicht beeinflussen. Idealerweise entsteht somit ein Phänotyp, der bis zum Rekombinationsereignis weitgehend normal ist und in seiner embryonalen und postnatalen Entwicklungsphase nicht durch den Knockout gestört wird (22).

1.6.2 ERT2-Cre-System

Es wurden bereits viele Arten von Cre generiert, um das Rekombinations-System für bestimmte Zwecke zu optimieren. Da in der vorliegenden Studie mit ERT2-Cre gearbeitet wurde, soll dieses System genauer beschrieben werden.

Das ERT2-Cre-System ermöglicht durch das Einbringen von Tamoxifen in den genveränderten Organismus eine Rekombination, die in allen Körperzellen stattfindet und eine hohe Effektivität aufweist (23).

Cre wurde für das ERT2-Cre-System so verändert, dass es mit einem abgewandelten Östrogenrezeptor T2 ein Fusionsprotein bildet. Die DNA-Sequenz für das ERT2-Cre-Fusionsprotein wurde in den ROSA26-Locus eingebracht, der ubiquitär transkribiert wird (24). ERT2-Cre ist in der Lage, Tamoxifen, einen Östrogen-Antagonisten, zu binden, nicht aber endogene Östrogene (22). Es verbleibt daher im Zytoplasma, bis Tamoxifen appliziert wird. Sobald Tamoxifen an ERT2-Cre bindet, wird der gesamte Komplex in den Zellkern transloziert und nimmt dort die Rekombination an den loxP-Sequenzen vor (24).

Der Genotyp der Versuchsmäuse bezüglich des ERT2-Cre wird in der vorliegenden Arbeit als ERT2-Cre⁺ oder ERT2-Cre⁻ bezeichnet.

1.6.3 Kollagen Typ I / loxP-Sequenz

Für die vorliegende Arbeit war das Gen für Kollagen Typ I von Interesse, welches mithilfe von ERT2-Cre (teilweise) ausgeschnitten werden sollte. Das Gen für Kollagen Typ I (Col1a1) liegt bei der Maus auf dem q-Arm von Chromosom 11 und besteht aus 51 Exonen (25).

Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte eine Mauslinie generiert werden, bei der ein bestimmter Teil dieses Gens von loxP-Sequenzen flankiert ist. Der zwischen den loxP-Sequenzen liegende DNA-Abschnitt, der aus dem Genom entfernt werden soll, beinhaltet unter anderem

die Kodierung für das Anfügen eines poly-A-Schwanzes an die zugehörige mRNA. Bestimmte Proteine erkennen diese Signalsequenz in der mRNA, spalten die mRNA und ermöglichen der Poly-(A)-Polymerase die Polyadenylierung des Transkripts. Es werden normalerweise etwa 50-250 Adenylreste an das 3'-Ende der mRNA angefügt. Der poly-A-Schwanz schützt die mRNA vor dem Abbau und erhöht die Effizienz der nachfolgenden Translation (26). Theoretisch sollte daher die mRNA für Kollagen Typ I ohne den poly-A-Schwanz recht instabil sein und kaum zur Translation kommen. Der Genotyp wird bezüglich der Expression des Kollagen Typ I-Gens in der vorliegenden Arbeit als $coll1a1^{fl/fl}$, $coll1a1^{fl/wt}$ bzw. $coll1a1^{wt/wt}$ (fl für Flox = loxP; wt = Wildtyp) angegeben.

Die detaillierte Beschreibung der einzelnen Versuchstiere lautet wie folgt:

- $ERT2-Cre^+ \times coll1a1^{fl/fl}$ (entspricht bei Induktion mit Tamoxifen einem homozygoten Kollagen-Knockout)
- $ERT2-Cre^+ \times coll1a1^{fl/wt}$ (entspricht einem heterozygoten Kollagen-Knockout)
- $ERT2-Cre^+ \times coll1a1^{wt/wt}$ (kein Kollagen-Knockout)
- $ERT2-Cre^- \times coll1a1^{fl/fl}$ (kein Kollagen-Knockout)

1.7 Zielsetzung

Die Nierenfibrose stellt das gemeinsame Endbild vieler komplexer pathologischer Prozesse dar und geht mit einem starken Funktionsverlust des Organs einher. Terminal niereninsuffiziente Patienten sind aufgrund regelmäßiger Dialysen in ihrer Lebensqualität erheblich eingeschränkt. Das Krankheitsbild der Nierenfibrose näher zu beleuchten, ist daher von großem Interesse.

Kollagen hat unter den Strukturproteinen den quantitativ größten Anteil an einem fibrotischen Gewebe (4). Die Rolle des Kollagens könnte deshalb mit einer wichtigen Stellschraube im Fibroseprozess gleichzusetzen sein und soll aus diesem Grund näher untersucht werden. Ebendiese Rolle des Kollagens im Tierversuch zu analysieren, gestaltet sich jedoch schwierig. Klassische Knockouts von Kollagen Typ I sind bei Homozygotie bereits intrauterin letal und nicht für Versuche geeignet.

Eine Lösung für dieses Problem bietet der induzierbare Knockout. Wenn der Knockout von Kollagen erst im adulten oder auch im präadulten bzw. immaturren Alter herbeigeführt wird, sollte das Tier unter diesen Umständen zunächst kaum Schäden erleiden, da die Zeit der

körperlichen Entwicklung, die eine besonders intensive Kollagensynthese erfordert, bereits abgeschlossen ist.

Tiere, die aufgrund des induzierten Knockouts keine oder nur noch eine sehr geringe Kollagenproduktion aufweisen, bieten vielfältige Möglichkeiten, fibrotische Krankheitsbilder im Tiermodell genauer zu erforschen.

Um in diesem Sinne Versuche durchführen zu können, müssen das Knockout-System jedoch zunächst getestet und die geeigneten Versuchsbedingungen evaluiert werden. In der vorliegenden Studie wurde das Tiermodell der UUO gewählt, um die Induktion des Kollagen-Knockouts zu etablieren. Mithilfe der UUO können entscheidende Fragen in Bezug auf den Knockout beantwortet werden.

Zunächst ist dies die Frage, ob die Versuchsmäuse durch die Gabe von Tamoxifen bzw. den dadurch ausgelösten Knockout von Kollagen Typ I an Vitalität verlieren oder ob sie selbst Belastungssituationen wie der UUO problemlos ausgesetzt werden können. Sofern die Tiere die Versuchsanordnung gesundheitlich tolerieren, kann die Auswertung des Experiments stattfinden.

Im Rahmen dieser Auswertung soll einerseits abgeschätzt werden, wie effektiv die Rekombination des Kollagen-Gens während der Induktion mit Tamoxifen stattgefunden hat. Andererseits soll analysiert werden, wie viel Kollagen sich tatsächlich in den fibrotischen, obstruierten Nieren der Versuchstiere abgelagert hat. Zu erwarten ist, dass nach einem erfolgreich induzierten Knockout die Ablagerung von Kollagen in die betroffene Niere der Knockout-Tiere wesentlich geringer ausfällt als bei den Kontrolltieren.

Abwägend zwischen den gesundheitlichen Auswirkungen auf die Versuchstiere und der Effektivität des Knockouts von Kollagen Typ I soll ermittelt werden, in welcher Form und in welcher Menge Tamoxifen appliziert werden muss, um sowohl ein optimales Rekombinationsergebnis als auch ein praktikables Tiermodell zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Materialien

Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Roth, Karlsruhe
Beize (Bouin's Solution)	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Acros Organics, New Jersey, USA
Cytofix-Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
DEPC-behandeltes Wasser	Ambion/life technologies, USA
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Faramount Aqueous Mounting Medium (Eindeckmedium)	Dako, Jena
Fluoromount G mit DAPI (Eindeckmedium)	eBioscience, San Diego, USA
Formaldehydlösung, 4%	Institut für Pathologie, Uniklinikum Regensburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Pepsin Reagent	Sigma Aldrich, Steinheim
peqGOLD TriFast (Lyse-Reagenz für RNA-/DNA-Extraktion)	Peqlab/VWR International GmbH, Erlangen
RNasin	Promega, Fitchburg, USA
Roti-Histokitt-Eindeckmedium	Roth, Karlsruhe
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl), 0,1mol/l	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma Aldrich, Steinheim
SuperBlock Blocking Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tissue Tek O.C.T. compound	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck, Darmstadt

Tab. 1 **Chemikalien.**

Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS (10x)) pH 7,4	11,5g Na ₂ HPO ₄ 80g NaCl 2g KH ₂ PO ₄ 2g KCl Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest.
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE (25x))	121 g Trisbase 28,55 ml Eisessig 50ml EDTA (0,5M, pH8) Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest.
Pepsin-Puffer (1% Pepsin-Reagenz)	10ml Pepsin Reagent 100ml HCl (0,1mol/l) Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest.
Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)	Sigma Aldrich, Steinheim
10x Amplification Buffer mit MgCl ₂	Genaxxon bioscience, Ulm
5x First Strand Buffer	Invitrogen/life technologies, USA
5x Phusion HF Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tab. 2 **Pufferlösungen.**

Enzyme

Bezeichnung	Aktivität	Bezugsquelle
Collagenase	0,25-1,0U/mg	Sigma Aldrich, Steinheim
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	2U/μl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reverse Transkriptase M-MLV	200U/μl	Invitrogen/life technologies, USA
RNAse A	700U/ml	Qiagen, Hilden
Taq DNA-Polymerase	5U/μl	Genaxxon bioscience, Ulm

Tab. 3 **Enzyme.**

Antikörper

Antikörper	Spezifität	Flourochrom/ Konjugat	Klon	Bezugsquelle	Konzentration
H2Kb	Maus	PECy7	AF6-88.5.5.3	eBioscience, San Diego, USA	0,2mg/ml
CD45	Maus	FITC	30-F11	Biolegend, San Diego, USA	0,5mg/ml
CD11b	Maus	PE	M1/70	Biolegend, San Diego, USA	0,2mg/ml
Kollagen I	Maus	Biotin	7G5D2	Chondrex, Redmond, USA	1mg/ml
Isotypkontrolle zu Kollagen I	Maus	Biotin	polyklonal	Rockland Immunochemi- cals Inc., Limerick	1mg/ml
Streptavidin	Biotin	APC	-	BDBiosciences, Heidelberg	0,2mg/ml
Kollagen I	Maus	-	polyklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien	1mg/ml
α -SMA	Maus	-	E184	Biocare Medical, Concord, USA	10mg/ml
Fibronektin	Maus	-	polyklonal	Sigma Aldrich, Steinheim	1mg/ml
F (ab') ₂ fragment of goat antirabbit IgG	Kaninchen	Alexa Flour 594	polyklonal	life technologies, USA	2mg/ml

Tab. 4 **Antikörper.**

Primer und andere Nukleotidprodukte

Bezeichnung	Schmelztemperatur	Bezugsquelle
Desoxyribonukleotide (A, T, C und G)	-	Promega, Fitchburg, USA
dNTP-Mix aus je 25µl o. g. Desoxyribonukleotide und 900µl Nuklease-freien Wassers	-	-
Oligonukleotide/Oligo(dT) ₂₀	-	Invitrogen/life technologies, USA
Primer Cre1 (PCR für ERT2-Cre) 5' GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA 3'	68,0°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Cre2 (PCR für ERT2-Cre) 5' GTG GCA GAT GGC GCG GCA ACA CCA TT 3'	69,5°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80027 flp-MAC1 (PCR für flox) 5' ACA TGC TCG CAC GTA CTT CAT TCC C 3'	64,9°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80028 flp-MAC1 (PCR für flox) 5' CAC CAC AGC TCT CTA AGA TCC CCC G 3'	67,9°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80011 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CCT GTC TTG TCC CCT CCT CTC TTT TAG G 3'	68,0°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80012 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CTC AGT CCC TGT TTC TGC TGC TTG AAT 3'	65,0°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer β-Aktin Fgf23 for #26 (TaqMan-PCR) 5' TAT GGA TCT CCA CGG CAA C 3'	64,0°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer β-Aktin Fgf23 rev #26 (TaqMan-PCR) 5' GTC CAC TGG CGG AAC TTG 3'	65,8°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Kollagen mCol1 for (TaqMan- PCR) 5' TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC 3'	57,3°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Kollagen mCol1 rev (TaqMan- PCR) 5' TCA AGC ATA CGG GTT TC 3'	57,3°C	Eurofins Genomics, Ebersberg

Primer Fibronectin (TaqMan-PCR) 5' TCC AGC CCC ACC CTA CAA GT 3'	61,4°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer rev-Fibronectin (TaqMan-PCR) 5' CCA GAC CAA ACC ATA AGA CA 3'	55,3°C	Eurofins Genomics, Ebersberg
GeneRuler 100bp DNA Ladder	-	Thermo Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 1kbp DNA Ladder	-	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tab. 5 **Primer (mit Sequenzen) und Nukleotidprodukte.**

Farbstoffe

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anilinblaulösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsinlösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Eosin-G-Lösung 0,5%	Sigma Aldrich, Steinheim
Mayers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
Phosphormolybdänsäurelösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphorwolframsäurelösung	Sigma Aldrich, Steinheim
SYBR Green (in QuantiTect SYBR Green PCR Kit)	Qiagen, Hilden
SYBR Safe	Invitrogen/life technologies, USA
Weigerts Eisen-Hämatoxylin Lösung A und B	Sigma Aldrich, Steinheim

Tab. 6 **Farbstoffe.**

Gebrauchsfertige Kits

Bezeichnung	Enthaltene Reagenzien (nur Bezeichnung)	Bezugsquelle
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	10x KAPA Express Extract Buffer 1 U/μl KAPA Express Extract Enzyme 2x KAPA2G Fast Genotyping Hot Start Mix	Peqlab/VWR International GmbH, Erlangen
Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit	Puffer ATL Proteinase K Puffer AL Puffer AW1 Puffer AW2	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy mini Kit (250)	Puffer RW1 Puffer RPE	Qiagen, Hilden

Tab. 7 Kits und Reagenzien.

Arzneistoffe

Handelsname	Wirkstoff	Konzentration	Hersteller
Antisedan	Ätipamezolhydrochlorid	5mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Domitor	Medetomidinhydrochlorid	1mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Fentanyl	Fentanylcitrat	0,1mg/ml	Janssen, Beerse, Belgien
Flumazenil	Flumazenil	0,5mg/ml	Hexal, Holzkirchen
Midazolam	Midazolam	1mg/ml	Rotexmedica, Trittau
Naloxon-ratiopharm	Naloxonhydrochlorid	0,4mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Tamoxifen	Tamoxifen (371,51g/mol)	≥ 99%	Sigma Aldrich, Steinheim
Medizinalfutter	Tamoxifencitrat (563,64g/mol)	400mg/kg	Harlan Laboratories, Rossdorf
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol	5%	BAYER, Leverkusen

Tab. 8 Arzneistoffe.

Operationsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dumont #7 Pinzette 11,5cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Extra feine Graefe Pinzette, gebogen, 10cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Extra feine Schere, gerade, 8,5cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Graefe Pinzette, gerade, 10cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Lexer-baby Schere, gebogen, 10cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Semken-Pinzette, gebogen, 13cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Semken-Pinzette, gerade, 13cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Retraktor, stumpf, 2,5cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Novosyn resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial, geflochten, 4/0	Braun, Melsungen
Optilene nicht resorbierbares monofiles Nahtmaterial 5/0	Braun, Melsungen

Tab. 9 **Operationsmaterial.**

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
PCR thermal cycler Mastercycler pro	Eppendorf AG, Hamburg
Geldokusystem Quantum 100	Vilber Lourmat SAS, Frankreich
ChemiDoc XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ViiA 7 Real-Time PCR system	Thermo Scientific, Waltham, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Mikroskop AxioStar plus	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop AxioObserver.Z1	Zeiss, Oberkochen

Tab. 10 **Geräte.**

Verwendete Software

Bezeichnung	Herausgeber
BD FACSDiva Software 8.0.1	Becton, Dickinson and Company
Carl Zeiss AxioVision Rel.4.8.1	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image Lab 5.2	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Meta Imaging Series 4.6 (MetaMorph)	Molecular devices, USA
NanoDrop2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
QuantumCapt	Vilber Lourmat SAS, Frankreich
ViiA 7	Life technologies, USA

Tab. 11 **Software.**

Sonstige Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Liquid Blocker – Super PAP Pen (Fettstift)	Science Services, München
Cell-Strainers, 70nm	Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA
Cell-Strainers, 40nm	Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA
AccuCheck Counting Beads	Invitrogen/life technologies, USA
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Deckgläser 24x24mm	Roth, Karlsruhe
Insulinspritzen 1ml, 27G	BD Medical, Heidelberg

Tab. 12 **Sonstige Materialien.**

2.1.2 Mäuse

Stamm	Herkunft
C57BL/6J	Charles River Laboratories, Sulzfeld
ERT2-Cre ⁺ (B6;129-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(cre/Esr1)Tyj/Nci})	Eigene Zucht, ursprünglich Charles River Laboratories, Sulzfeld
colla1 ^{fl/fl}	Eigene Zucht
ERT2-Cre ⁺ x colla1 ^{fl/fl}	Eigene Zucht

Tab. 13 **Mausstämme.**

Die Mäuse waren entweder im Tierlaboratorium D3 der Universitätsklinik Regensburg in SPF-Barriere-Haltung untergebracht oder im Tierlaboratorium H4 in konventioneller Haltung. Der Hell-Dunkel-Wechsel folgte einem 12-Stunden-Rhythmus, die Temperatur betrug konstant 21°C ± 2°C, die Luftfeuchtigkeit lag bei ca. 60%. Die Tiere erhielten Wasser und Standardfutter *ad libitum*, ggf. gemäß den Versuchsanordnungen stattdessen Medizinalfutter. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Berücksichtigung der geltenden Tierschutzbestimmungen und pathogenfrei durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Induktion des konditionellen Knockouts

2.2.1.1 Allgemeines Prinzip

Wie bereits dargestellt, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie ein Maus-Modell getestet, bei dem der Knockout von Kollagen Typ I erst zu einem beliebigen postnatalen Zeitpunkt

herbeigeführt wird. Beim ERT2-Cre-System ist das Einbringen von Tamoxifen in den Mausstoffwechsel nötig, um ERT2-Cre in den Zellkern zu translozieren, wo es die Rekombination im Bereich der flox-Sequenzen vornimmt.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Möglichkeiten genutzt, Tamoxifen zu applizieren. In einem Teil der Versuche wurde Tamoxifen intraperitoneal (*i.p.*) injiziert, im anderen Teil der Versuche wurde Tamoxifen dem Futter der Versuchs- und Kontrollmäuse zugesetzt (Anwendung über Medizinalfutter).

2.2.1.2 Praktische Durchführung

Für die *i.p.* Injektion von Tamoxifen wurde kristallines Tamoxifen (>99%) mit einer Feinwaage abgewogen und in handelsüblichem Olivenöl bei 70°C für etwa zwei Stunden im Wasserbad gelöst. Die Konzentration betrug 10mg/ml. Mithilfe einer 27G-Insulinspritze (1ml) wurden den Mäusen an vier Tagen (Tag 0, 3, 5 und 7 des Versuches) jeweils 100µl des Tamoxifen in Öl *i.p.* injiziert (24).

Zur oralen Verabreichung von Tamoxifen wurde einer Standarddiät Tamoxifencitrat (66% Tamoxifen) zugefügt. Die Konzentration betrug 400mg Tamoxifencitrat auf 1kg Futter (27). Die Mäuse erhielten dieses Medizinalfutter je nach Versuchsanordnung mehrere Wochen lang *ad libitum*, ehe die Ernährung wieder auf die im Tierlaboratorium D3 (Regensburg) übliche Standarddiät umgestellt wurde.

2.2.2 Unilaterale Ureterobstruktion

2.2.2.1 Allgemeines Prinzip

Die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) stellt eine vergleichsweise einfache und zuverlässig reproduzierbare Möglichkeit dar, eine Nierenfibrose zu erzeugen. Im Rahmen der Operation wird einer der beiden Ureteren mit einer Ligatur versehen. Durch den Verschluss des Ureters bildet sich ein Harnstau aus, der die zugehörige Niere schädigt, Entzündungszellen infiltrieren lässt und binnen 7-9 Tagen zu einer Fibrose des Organs führt (16).

2.2.2.2 Praktische Durchführung

Vor Beginn des Eingriffs wurden folgende Vorbereitungen getroffen:

Die Narkoselösung wurde aus den in Tab. 8 bzw. 14 aufgeführten Medikamenten, die antagonistisierende Lösung (Antagonist) aus den in Tab. 8 bzw. 15 aufgeführten Medikamenten

angesetzt. Eine Heizplatte wurde auf ca. 30°C eingestellt, um die Maus während der Operation (OP) vor Unterkühlung zu schützen.

Medikament	Konzentration	Eingesetzte Menge
Domitor	1mg/ml	1ml
Midazolam	1mg/ml	10ml
Fentanyl	0,05mg/ml	2ml

Tab. 14 **Zusammensetzung der Narkosestammlösung.**

Medikament	Konzentration	Eingesetzte Menge
Antisedan	5mg/ml	0,5ml
Flumazenil	0,5mg/ml	5ml
Naloxon	0,4mg/ml	3ml

Tab. 15 **Zusammensetzung der Narkose-antagonisierenden Stammlösung.**

Den Mäusen wurde *i.p.* ca. 7µl/g Körpergewicht der Narkoselösung verabreicht. Durch Setzen eines Schmerzreizes im Mittelfußbereich wurde nach einigen Minuten die ausreichende Tiefe der Narkose überprüft. Um ein Austrocknen der Augen im OP-Verlauf zu vermeiden, wurden die Augen mit einer Bepanthen® Augen- und Nasensalbe benetzt. Die Mäuse wurden auf der Heizplatte, die zum Schutz vor lokaler Überhitzung mit einem Tuch abgedeckt war, in Rückenlage gebracht. Der Operationsbereich wurde mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Ein etwa 1-2cm langer Hautschnitt im Bereich des rechten Unterbauches leitete die Operation ein (vgl. Abb. 2.1a). Nach Präparation durch das subkutane Fettgewebe erfolgte das Eröffnen der muskulären Bauchdecke und des Peritoneums. Vier Retraktoren wurden in die Wunde eingesetzt und auf leichte Spannung gebracht, um bessere Sicht auf den Operationsbereich zu gewährleisten. Unter Mikroskopsicht (10-fache Vergrößerung) konnte der intraperitoneal verlaufende Anteil des rechten Ureters (schematisch dargestellt in Abb. 2.1b) aufgesucht und

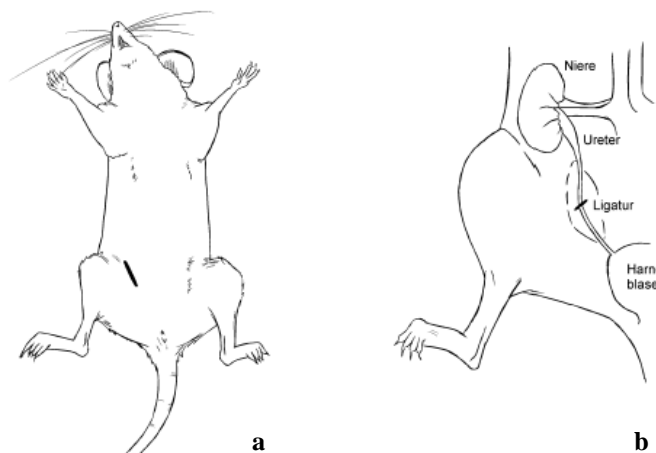


Abb. 2.1 **Operationstechnik für die unilaterale Ureterobstruktion.**

a Die Maus wird unter Vollnarkose in Rückenlage gebracht. Der Schnitt durch Haut, Bauchdecke und Peritoneum erfolgt im rechten Unterbauch (schwarze Linie).
b Vereinfachte Situsdarstellung. Durch den Schnitt wird intraperitoneal der rechte Ureter aufgesucht und ligiert, sodass kein Harn mehr das Ureterlumen zur Blase passieren kann.

dargestellt werden. Mittels zweier Pinzetten (extra fein, gebogen) wurde der Ureter leicht angehoben, ein Stück nicht resorbierbarer Faden unter ihm hindurchgeführt und zu einer Ligatur verknötet. Nach Setzen einer zweiten Ligatur im Abstand von 2-3mm zur ersten und letzter Blickkontrolle auf die korrekte Lage der Ligaturen wurden die Retraktoren entfernt. Der Verschluss der Bauchdecke und der Dermis erfolgten mit jeweils 3-4 Einzelknopfnähten aus Novosyn® (4-0) resorbierbarem Nahtmaterial bzw. Optilene® (5-0) nicht resorbierbarem Nahtmaterial. Nach nochmaliger Reinigung der Wunde mit 70%igem Ethanol wurde die Rückenlage aufgehoben. Die Injektion des Antagonisten (ca. 8µl/g Körpergewicht) subkutan in den Nacken beendete die OP. Die Aufwachphase verlief unter einer Rotlichtwärmelampe.

2.2.2.3 Beenden der Versuchstiere und Präparation der Nieren

Sieben Tage nach der UUO ist die Fibrose in der betroffenen Niere bereits stark ausgeprägt. Das Beenden der Tiere erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Zur Präparation der Organe wurden der Bauchraum sowie der Thorax eröffnet und sowohl die ligierte, fibrosierte Niere als auch die nicht ligierte, intakte kontralaterale Niere entnommen, letztere als eine interne Negativkontrolle. Die Kapsel jeder Niere wurde abpräpariert, und jede Niere parallel zur Frontalebene halbiert. Die Hälften wurden in axialer Ebene nochmals aufgeteilt, um schließlich je ein Viertel für die Paraffin- und die Kryoeinbettung zur Verfügung zu haben, je ein Sechzehntel für die Analyse von mRNA und genomischer DNA sowie die verbliebenen drei Achtel für die FACS-Analyse. Auch eine Schwanzbiopsie wurde abgenommen.

2.2.3 Genotypisierung der Versuchstiere

2.2.3.1 Allgemeines Prinzip

Der Genotyp der Versuchsmäuse lässt sich mittels Polychain-Reaction (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese ermitteln.

Im Zuge der PCR werden verschiedene Temperaturphasen zyklisch durchlaufen, um die Schritte einer DNA-Replikation zu imitieren und bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell zu vermehren. Diese können dann per Gelelektrophorese detektiert werden.

Für die Polykettenreaktion wird Folgendes benötigt:

- DNA-Probe
- Primer (forward und reverse Primer)
- Desoxyribonukleotide
- DNA-Polymerase

- Geeigneter Puffer mit $MgCl_2$ (Mg^{2+} ist nötig für die Bindung der Primer an die DNA und die Funktionsfähigkeit der Polymerase)

Um die zu testende DNA aus einer Gewebeprobe zu isolieren, werden Lysepuffer und Proteinasen verwendet, die das Gewebe angreifen und seine Struktur zersetzen.

Weil DNA UV-Licht im Bereich von 260nm absorbiert, lässt sich die Konzentration der gewonnenen DNA über die Bestimmung der Lichtabsorption berechnen.

Der PCR-Ansatz bestehend aus der DNA-Probe und oben genannter Reagenzien wird sodann zyklischen Temperaturänderungen unterworfen. Die Zyklen unterteilen sich jeweils in drei Phasen. In der Denaturierungsphase bei ca. 95°C werden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. In der Annealingphase bei ca. 65°C lagern sich Primer, welche den zu vermehrenden DNA-Abschnitt flankieren, an ihre jeweils komplementären Sequenzen in der DNA-Probe an. In der Elongationsphase bei ca. 70°C bindet die DNA-Polymerase an die Primer und verlängert das neu entstehende DNA-Stück durch den Anbau von Desoxyribonukleotiden. Nach dieser Phase beginnt der nächste Zyklus mit einer erneuten Denaturierung der DNA-Doppelstränge, bis etwa 30-40 Zyklen stattgefunden haben. Die Menge des gewünschten DNA-Abschnittes erhöht sich exponentiell, erreicht allerdings nach ca. 40-45 Zyklen ein Plateau.

Nach der PCR wird das Produkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen, an welches eine elektrische Spannung angelegt wird. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert sie in Richtung Anode. Allerdings finden kurze DNA-Stücke ihren Weg durch das Agarose-Netz schneller als lange Stücke, sodass sie in einer gegebenen Zeit eine längere Strecke zurücklegen. Wenn dem Gel SYBR Safe zugefügt wird, interkaliert dieses in DNA und kann in diesem Zustand unter UV-Licht detektiert werden. So lassen sich die entstandenen DNA-Banden sichtbar machen. Durch den Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel aufgebrauchten DNA-Ladder, der definierte unterschiedlich lange DNA-Stücke enthält, lässt sich abschätzen, wie viele Basenpaare die vervielfältigten DNA-Sequenzen enthalten.

2.2.3.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die Genotypisierung der Versuchstiere auf ERT2-Cre, die Flox-Sequenzen und das Kollagen Typ I-Gen erfolgte mithilfe von DNA aus Schwanzbiopsien. Für die Isolierung der DNA und das Ansetzen der PCR wurde das KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit von peqlab verwendet.

Zu einer ca. 2mm langen Schwanzbiopsie wurden 10µl 10xKAPA Express Extract Buffer, 2µl KAPA Express Extract Enzyme und 88µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Der Ansatz

wurde 10 Minuten lang bei 75°C inkubiert, um das Gewebe enzymatisch zu lysieren. Um den Verdau durch Hitzeinaktivierung des Lyse-Enzyms abzustoppen, folgte eine 5-minütige Inkubation bei 95°C. Da das Gewebe nicht vollständig lysiert werden konnte, wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Cup überführt.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem nanoDrop 2000.

Damit die anschließende PCR eine hohe Effektivität aufwies, mussten zwischen 60 und 100ng DNA je Probe eingesetzt werden. Hinzugefügt wurden 9µl Nuklease-freies Wasser, 1,25µl jedes Primers und 12,5µl 2xKAPA2G Fast Genotyping Mix, welcher bereits alle weiteren nötigen Reagenzien für die PCR enthielt (Auflistung der Primer siehe Materialauflistung Kap. 2.1.1).

Die PCR-Bedingungen für die jeweiligen Genotypisierungen sind in Tab. 16 bis 18 aufgeführt. Die Temperatur während der Annealingphase wurde abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt, während die Temperatur während der Elongationsphase optimal auf die Eigenschaften der Polymerase ausgerichtet sein musste. Die Dauer der Elongationsphase wurde durch die Geschwindigkeit der Polymerase sowie die Länge des zu vermehrenden DNA-Abschnittes bestimmt, musste jedoch mindestens 1 Minute betragen, um sicher zu stellen, dass die Polymerase genügend Zeit hatte, ihre volle Arbeitsgeschwindigkeit zu erreichen.

Für die Gelelektrophorese wurden je 20µl des PCR-Produkts auf ein ca. 1,5%iges Gel aus Agarose und TAE-Puffer aufgetragen, das den Farbstoff SYBR Safe in einer Verdünnung von 1:50.000 enthielt. Durch die an das Gel angelegte Spannung von 60V für 10 Minuten und 95V für weitere ca. 35 Minuten trennte sich das PCR-Produkt je nach Sequenzlänge in Banden auf (s. Abb. 2.2). Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und mithilfe des Programms QuantumCapt (Vilber Lourmat SAS) fotografiert. Anhand der optischen Analyse ließ sich der Genotyp der Mäuse feststellen.

Die zu erwartenden Banden sind in Tab. 19 aufgelistet.

ERT2-Cre			
Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	3min	94°C	
	30sek	94°C	35
Annealing	30sek	65°C	Wiederholungen
Elongation	1min	72°C	
Stabilizing	10min	72°C	

Tab. 16 **Reaktionsbedingungen der PCR für ERT2-Cre.**

Flox			
Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	3min	94°C	
	30sek	94°C	35
Annealing	30sek	65°C	Wieder- holungen
Elongation	1min	72°C	
Stabilizing	10min	72°C	

Tab. 17 **Reaktionsbedingungen der PCR für die Flox-Sequenzen.**

Kollagen I			
Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	30sek	98°C	
	10sek	98°C	35
Annealing	30sek	65°C	Wieder- holungen
Elongation	2,5min	72°C	
Stabilizing	10min	72°C	

Tab. 18 **Reaktionsbedingungen der PCR für Kollagen Typ I.**

	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
ERT2-Cre	-	726bp	726bp
Flox-Sequenz	459bp	459bp + 569bp	569bp
Kollagen I	4227bp	4227bp + 746bp	746bp

Tab. 19 **Erwartete PCR-Banden für die drei angewandten PCR-Reaktionen.**

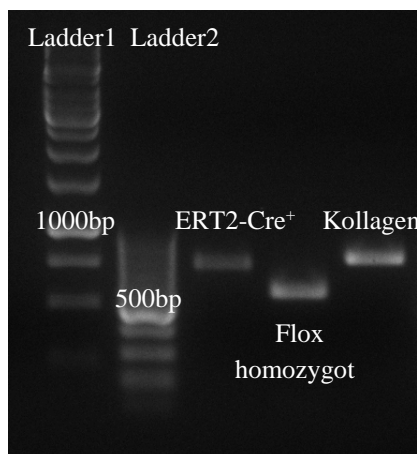


Abb. 2.2 **Beispielbild zur Gelelektrophorese.** Von links nach rechts sind aufgetragen: die beiden verwendeten Ladder (s. Tab. 5), PCR-Probe mit positiver Bande für ERT2-Cre(726bp), PCR-Probe mit positiver Bande für homozygotes Vorliegen von Flox (569bp), PCR-Probe mit rekombiniertem Kollagen-Gen (746bp).

Eine quantitative Auswertung der Banden ergänzte das Ergebnis der PCR. Zu diesem Zweck wurde die Lichtintensität der Banden unter UV-Licht mithilfe des Programms ImageLab von Bio-Rad Laboratories ausgemessen und in Relation zu Referenzbanden gesetzt.

Konkret wurden einerseits die Banden für Flox vor und nach der Rekombination betrachtet. Im Zuge der durch Tamoxifen ausgelösten Rekombination wird auch eine der beiden Primer-Bindestellen für Flox aus dem Genom ausgeschnitten und abgebaut (s. Abb. 2.3). Mit nur

```

tgaataccatcccactcaatactcagtgtaacttgacacctgacagcctgtcttctccctctctctttagGAC
CCCAGGCCCGTGGTGACAAGGGTGAGACAGGCGAACAAGGTGACAGAGGCATAAAGGTCATCGTGGCTTCTCT
GGTCTCCAGGGTCTCTCTGGTCTCTCTGtgagtataactcaacttcccaggccctgggtgccatcaggccctttccac
cataccctgatgcagatcacatgggtgggggggggacacttgcctcagtgcttactctagatagacattctgtatccct
tcctagtggaggtgaggggacagacagacagacagaggggtcaaagaaggatttggggagtggtctaaaaat
gaggggatattgttaccctcattgcccctgaactgcttttctctgttcttcagGGTCTCTGGTGAACAAGGCCCT
CTGGAGCTTCAGGTCTCTGAGGCCCGGGtaagttgcattcttccattcttctctgggttctctccctgtcttgg
ttactttcagatattccctctgttcttcagagagaagttcagagaccagacaggggggtgggagaaaaaagaagcttgg
tcttacagaacctttagaccttcccacccgtgccSACAGGGTCAGCTAGCTGCGGCCCGGAAGTTCCTATTCTCTAGA
AGGTATAGGAACCTTCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATTAAATCGCCCAATcccttgcaaac
ctggccataggaactagttgaggggacccctctgagagacagaagcagagactgggaggagccagcagctgggggggagg
ggaaacacttctgagcgggagtttgggggctgccttgagtttctagccacttttttaacatctc
.
.
TGCATGTGCAGTGGCCTCTGAATTTCTTCTGGGACGTGGGAGGTGGGATCCAGGGACAGGGCTCTGGGATGGG
GGACTTGCCCTTCTACCCCTGCCCTTTCTCTCCCTCACTTCTCATCCAGATATTGCCACCTTCTCTCTTGGCTGT
CTTATGCCCTTAGACCTTTTCTTGCCCTCTTTTACCTTTTCTCTTCCAGCTCTCTTGTGCATCCCGAGATCCCC
AGCTTCACCACTTCAATCCAGGTCGACAGCATTGCGGACATGCTCGCAGCTACTTCACTCCAGATCTCTCTC
TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACACACACACACATACACACACACACCTC
AGGCCCGCCATCCCAACAATAACACAGGGTCAGCTAGCTGCGGCCCGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGA
CTTCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATTAAATCGCCCAATATCATCTCTCATGCTGCAGAC
CTGAGGCCCTGGGAGGTGTTGCCCATGGATCCTGGGAGGTTTCATGAGCCCTCAAAGGATTCAAGCAGCAGAAACAGG
GACTGAGACATGGAGGACAGGTTGCTCCTTGGTCACACATGGAGGGGTAGCTGGCCCTCTCCCACTCTAGCCCAAA
GAAACCATAATTTAGTATAGAAGGGGCCCTTCTAATGCTGGGGTGTACAAAGGAGGATGAGAATTTCTGGGTACCCC
TTGATCTCACCAGAGAGAGGTGCCAGCCCTCAAGGAACCTCTCCCAGGGGATCTTAGAGAGCTGTGGTGAACTTC
CGGGGTGTACACAGAAAGACAGGACCCCATCAGAGGTGCCGGGACGATAGCATGCTGGCTCGGTACAGGGA
GCCCGTGGAAATTTCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTCAGAGAATGGGGACGGTGACATAGTAGAAGGCCCGAGAATCCAGCAGGCAGA

```

Abb. 2.3 Ausschnitt aus dem mit Flox-Sequenzen versehenen Kollagen Typ I-Gen. Die Exone sind in Großbuchstaben dargestellt, die Introns in Kleinbuchstaben. Die Punkte markieren einen in dieser Abb. nicht dargestellten Bereich des Gens. Im Zuge der Rekombination mittels ERT2-Cre wird der Genabschnitt zwischen den Flox-Sequenzen (grau unterlegt) ausgeschnitten. Die Primerbindestellen für die PCR von Kollagen sind gelb unterlegt. Grün unterlegt sind die Primerbindestellen der PCR für Flox. Die obere dieser Bindestellen wird bei der Rekombination entfernt, sodass der Primer nicht mehr binden kann und kein PCR-Produkt für Flox entsteht.

einer verbleibenden Bindestelle kann die PCR nicht mehr regelgerecht ablaufen, sodass nach der Rekombination die Flox-Bande verschwindet oder sich bei nicht vollständiger Rekombination zumindest geringer ausgeprägt darstellt.

Um die Banden vergleichbar zu machen, wurde eine definierte Menge von 60ng DNA für die Flox-PCR eingesetzt. Abzüglich der Hintergrundintensität wurde aus den Intensitäten der Flox-Banden über die Intensität einer Bande aus dem DNA-Ladder mit bekannter DNA-Konzentration die Menge der in den Flox-Banden enthaltenen DNA in Nanogramm (ng) berechnet. Anhand des Vergleichs der durchschnittlichen DNA-Menge vor und nach dem Knockout-Ereignis bzw. zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ließ sich die Effektivität der induzierten Rekombination ablesen.

Eine weitere Art der quantitativen Auswertung erfolgte für die PCR-Bande für ERT2-Cre mit dem Ziel, eine Aussage über vorliegende Homo- oder Heterozygotie treffen zu können, die primär nicht an der PCR-Bande abzulesen ist. Zu diesem Zweck wurde vor der Gabe von Tamoxifen eine Ratio aus der ERT2-Cre- und der Flox-Bande der Versuchstiere gebildet (*Intensität der ERT2-Cre-Bande/Intensität der Flox-Bande*). Je größer die Ratio ist, mit umso höherer Wahrscheinlichkeit kann von der Homozygotie für ERT2-Cre ausgegangen werden sowie von einer möglicherweise damit einhergehenden effektiveren Rekombination bei der Gabe von Tamoxifen. Tiere mit besonders hoher Ratio konnten somit für die Zucht ausgewählt bzw. Tiere mit außerordentlich niedriger Ratio von den Versuchen ausgeschlossen werden.

2.2.4 Analyse genomischer DNA

2.2.4.1 Allgemeines Prinzip

Um den Nachweis der Rekombination des Kollagen Typ I-Gens auch im Zielorgan zu erbringen, wird eine PCR für Kollagen basierend auf genomischer DNA aus den zu Versuchsende entnommenen Nieren durchgeführt.

Nach der Isolation der DNA aus dem Gewebe erfolgt die Konzentrationsmessung über die UV-Licht-Absorption selbiger DNA sowie PCR und Gelelektrophorese nach dem gleichen Prinzip wie unter 2.3.1 beschrieben.

2.2.4.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood&Tissue Kit von Qiagen aus dem Sechzehntel einer Niere isoliert (s. 2.2.2.3), welches zuvor mit einem Einmalskalpell in kleine Stücke zerteilt, in ein Eppendorf-Cup überführt und zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden war. Nach dem Auftauen der Gewebeprobe wurden 180µl Puffer ATL und 20µl Proteinase K hinzugefügt. Dieser Ansatz inkubierte unter gelegentlichem Vortexen für 4-5 Stunden bei 56°C und ca. 450rpm im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg), bis das Gewebe vollständig lysiert war. Die anschließende zweiminütige Inkubation mit 4µl RNase A gewährleistete den Abbau von vorhandener RNA, die später folgende Reaktionen beeinträchtigen könnte. Nach gründlichem Vortexen wurden jeweils 200µl Puffer AL und 100%iger Ethanol hinzugefügt, jeweils gefolgt von sofortigem Vortexen. Der gesamte Cup-Inhalt wurde in eine DNeasy Mini spin column überführt, die in einem Collection Tube (2ml) steckte (beides im DNeasy Blood&Tissue Kit enthalten). Es folgten mehrere Zentrifugationsschritte (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) mit unterschiedlichen Puffern, nach denen jeweils der sich im Collection Tube befindliche Durchfluss verworfen wurde:

- 1 Minute bei 6.000g
- 500µl Puffer AW1 zugeben, 1 Minute bei 6.000g
- 500µl Puffer AW2 zugeben, 3 Minuten bei 20.000g

Schließlich wurden 200µl Nuklease-freies Wasser auf die Membran der DNeasy Mini spin column pipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute lang bei 8.000g zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Durchfluss.

Die Konzentration der DNA wurde mit dem nanoDrop 2000 gemessen.

Der Ansatz für die Kollagen-PCR enthielt ca. 20ng DNA, 32µl Nuklease-freies Wasser, 10µl 5x Phusion HF Buffer, 1µl des dNTP-Mixes (Lösung mit allen vier Desoxyribonukleotiden, s. Tab. 5), 0,75µl je Primer (Primer 80011cre-MAC1 und 80012cre-MAC1) und 0,5µl Phusion Hot Start II DNA Polymerase.

Die PCR-Bedingungen sind in Tab. 20 aufgeführt.

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1,0%iges Agarose Gel mit zugesetztem SYBR Safe aufgetragen. Die Spannung betrug 50V für 10 Minuten und im Anschluss 60V für ca. 60 Minuten. Die Detektion der Banden, die für nicht rekombiniertes Kollagen bei 4227bp und für Kollagen nach erfolgreicher Rekombination bei 746bp liegen (s. Tab. 19), erfolgte mit QuantumCapt unter UV-Licht.

Kollagen I			
Phase	Dauer	Temperatur	
Denaturierung	30sek	98°C	
	10sek	98°C	35
Annealing	30sek	65°C	Wiederholungen
Elongation	2,5min	72°C	
Stabilizing	10min	72°C	

Tab. 20 **Reaktionsbedingungen der PCR für Kollagen Typ I.**

2.2.5 Analyse von messenger RNA (mRNA)

2.2.5.1 Allgemeines Prinzip

Entscheidend für den Erfolg des Kollagen-Knockouts ist allerdings nicht der bloße Nachweis der Rekombination in der DNA, sondern auch die tatsächlich verminderte Expression von Kollagen. Weil die Synthese von mRNA einen direkten Zwischenschritt zur Proteinsynthese darstellt, sollte die aus einer Nierengewebsprobe isolierte mRNA quantitativ analysiert werden. Betrachtet wurden in der vorliegenden Studie die mRNA für Kollagen Typ I, für das mit Kollagen assoziierte Strukturprotein Fibronektin sowie für den Housekeeper β -Aktin, dessen Expression nicht über entzündungsbedingte Mechanismen reguliert wird und somit als Referenz dienen kann.

Im Detail wird die mRNA mithilfe einer reversen Transkriptase in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben und einer PCR unterworfen (Prinzip wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben). Durch Hinzufügen eines Farbstoffes zum PCR-Ansatz, z. B. SYBR Green, kann das PCR-Produkt detektiert werden. SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert in diesem Zustand unter der Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 497nm Licht

der Wellenlänge 520nm. Bindet SYBR Green nicht an DNA oder nur an einsträngige DNA, so sinkt die Emission stark ab.

Im Rahmen einer Real-time PCR weist der Graph aus den aufgezeichneten Fluoreszenzwerten über die Zeit erst eine exponentiell ansteigende Kurve auf, die nach einer bestimmten Anzahl von PCR-Zyklen zu einem Plateau abflacht. Je höher die Konzentration der jeweiligen cDNA im PCR-Ansatz ist, umso früher erfolgt der steile Anstieg des Graphen. Der Zeitpunkt des beginnenden Graphenanstiegs bzw. des Überschreitens eines gesetzten Schwellenwertes wird als CT (threshold cycle) angegeben. Auch eine Schmelzkurve kann aufgezeichnet werden. Sie zeigt an, bei welcher Temperatur sich die gebildeten DNA-Doppelstränge auftrennen, und liefert damit indirekte Informationen über die Beschaffenheit des DNA-Abschnittes.

2.2.5.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die Isolation der mRNA erfolgte aus dem Sechzehntel einer Niere, welches nach der Materialgewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert wurde.

Die aufgetauten Proben wurden zusammen mit 800µl Trifast-Reagenz in ein Röhrchen mit Metallkügelchen gegeben und mittels eines Homogenisators (Homogenisator FastPrep-24, MP Biomedicals) zerkleinert. Das Produkt wurde in ein 1,5ml-Cup überführt und zusammen mit 200µl Chloroform für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000g und 4°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) wurde die obere Phase, in der sich unter anderem die mRNA befand, in ein frisches Cup überführt und 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt.

Die folgenden Schritte geschahen mithilfe des RNeasy mini Kit (250) von Qiagen. Der gesamte Cup-Inhalt wurde auf die Membran einer RNeasy Mini Spin Column pipettiert, die sich in einem 2ml-Collection Tube befand, und für 20 Sekunden bei 8.000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wiederholte sich zweimal, nachdem jeweils 700µl Puffer RW1 bzw. 500µl Puffer RPE auf die Säule gegeben worden waren. Nach erneutem Pipettieren von 500µl Puffer RPE auf die Säule erfolgte die Zentrifugation für 2 Minuten bei 8.000g und, wie bei jedem vorherigen Zentrifugationsschritt, das Verwerfen des Durchlaufs. Nun wurde die Säule in ein frisches 1,5ml-Cup gesetzt und mit 30µl DEPC-behandeltem Wasser befüllt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 8.000g wurde zur Erhöhung der mRNA-Ausbeute der Durchlauf nochmals auf die Membran gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Messung der Konzentration der nun im Durchlauf befindlichen mRNA erfolgte mit dem nanoDrop 2000.

Für die reverse Transkription der mRNA wurde diese so mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, dass sich in einem Ansatz von 9µl 2µg mRNA befanden. 1µl Oligo(dT)₂₀ je Ansatz diente als Primer für die reverse Transkription und konnte im Rahmen einer dreiminütigen Inkubation bei 70°C an die mRNA binden. Nach sofortiger Abkühlung im Eisbad wurden zu den Proben 0,75µl Nuklease-freies Wasser gegeben, 4µl des dNTP-Mixes, 4µl First Strand Buffer, 0,25µl RNasin (RNase-Inhibitor) und 1µl Reverse Transkriptase M-MLV. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C und anschließend 2 Minuten bei 94°C inkubiert, um die Reaktion abzustoppen, und zuletzt mit Nuklease-freiem Wasser auf 500µl aufgefüllt. Der Ansatz für die Real-time PCR enthielt jeweils 10µl SYBR Green, 1µl jedes Primers, 3µl Nuklease-freies Wasser und 5µl der cDNA-Lösung und wurde in je 3-facher Ausführung auf eine 384-Well-Platte aufgetragen. Als Negativ-Kontrolle dienten je 3 Wells mit Nuklease-freiem Wasser und mit dem Ansatz aus einer reversen Transkription, dem keine Transkriptase beigelegt worden war. Zur Ermittlung einer Standardkurve und der Effektivität der PCR wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) einer Probe aufgetragen. Die PCR erfolgte mit dem TaqMan von life technologies (Programm: viia 7, life technologies). Die Bedingungen waren wie folgt (Tab. 21):

Dauer	Temperatur	
2min	50°C	
10min	95°C	
15sek	95°C	
1min	60°C	40 Wiederholungen
15sek	95°C	Aufnahme der Schmelzkurve
1min	60°C	
15sek	15sek	

Tab. 21 Reaktionsbedingungen der qPCR für Kollagen Typ I, Fibronectin und β -Aktin.

Aus den CT-Werten dreier Wells mit derselben Probe und denselben Primern wurden Mittelwerte errechnet. Durch die Subtraktion des Mittelwerts für Kollagen bzw. Fibronectin von dem Mittelwert des Referenzgens β -Aktin entstand ΔCT . Mithilfe der Formel $2^{-\Delta CT}$ konnten die Proben dahingehend miteinander verglichen werden, wie viel Kollagen Typ I und Fibronectin die Gewebeproben exprimierten.

2.2.6 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

2.2.6.1 Allgemeines Prinzip

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Zellen auf bestimmte Eigenschaften, Oberflächenmarker oder intrazelluläre Partikel hin untersucht werden.

Dazu wird zunächst aus einer Gewebeprobe eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die gewonnenen Zellen werden durch die Messküvette eines FACS-Gerätes gesaugt oder gedrückt und einzeln je nach ihrer lichtbrechenden Eigenschaft hinsichtlich Größe und Granularität analysiert. Als Forward-Scatter (FSC) wird hierbei die Streuung des Lichts nach vorne bezeichnet, welche von der Zellgröße abhängt. Die Lichtstreuung zur Seite wird als Side-Scatter (SSC) bezeichnet und ist abhängig von der Granularität der Zelle.

Die Zellen können zusätzlich mit Fluoreszenzstoffen, die an Antikörper gebunden sind, gelabelt werden. Die Antikörper wiederum sind gegen bestimmte extrazelluläre Oberflächenantigene der Zelle oder intrazelluläre Strukturen gerichtet. Damit die Antikörper im Rahmen einer intrazellulären Färbung ins Zellinnere gelangen können, müssen die Zellen fixiert und ihre Zellmembranen permeabilisiert werden. Dies geschieht zum Beispiel mit Formaldehyd und Saponin.

Durch die Bestrahlung mit Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das vom Gerät detektiert wird. Überlappungen der Fluoreszenzspektren verschiedener Farben müssen vermieden oder durch eine entsprechend eingestellte Kompensation aus der Bewertung in positive und negative Ereignisse herausgenommen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die registrierten Events können in einem Dotplot aufgetragen werden. Durch das Setzen verschiedener Gates innerhalb dieser Dotplots werden Zellpopulationen erfasst und ausgezählt (28).

Counting Beads können verwendet werden, um die Größe von Zellpopulationen in einem ganzen Organ zu berechnen, da sie in einer bekannten Menge eingesetzt werden. Der sogenannte Bead-Count gibt an, wie viele Beads in einem μl der Stammlösung enthalten sind.

Für die vorliegende Arbeit wurde das FACS Canto II von BD Biosciences verwendet, das über drei Laser und acht Messkanäle verfügt. Die Farben FITC, PE, PE-Cy7 und APC wurden als geeignet für eine gleichzeitige Färbung erachtet, da sich ihre Fluoreszenzspektren nicht zentral überlappen. (vgl. Abb. 2.4)

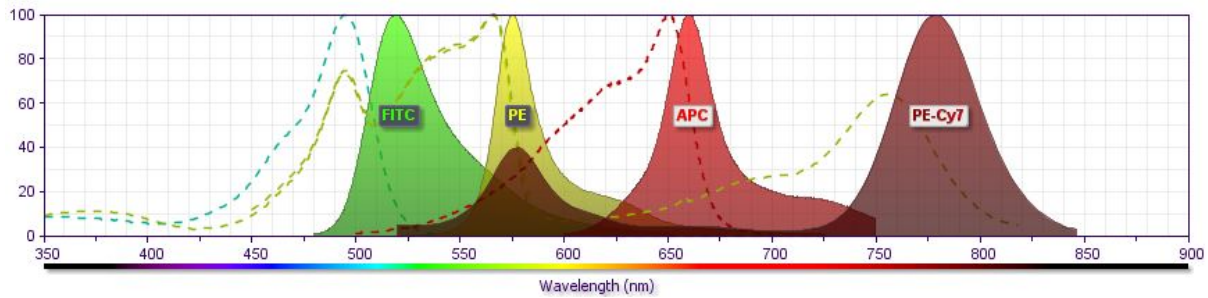


Abb. 2.4 **Fluoreszenzspektren der verwendeten Farben im FACS.** Auf der x-Achse ist die Wellenlänge des Lichtes in nm aufgetragen, auf der y-Achse die Lichtintensität, deren Maximum in dieser Abbildung für jede Farbe auf den Wert von 100 normiert wurde. Gestrichelt eingezeichnet sind die Wellenlängenbereiche, in denen die vier verwendeten Farben das Licht absorbieren, mit durchgehender Linie sind die Bereiche eingezeichnet, in denen die Fluoreszenzfarben Licht emittieren, das vom FACS-Gerät detektiert wird. (modifiziert nach: https://www.bdbiosciences.com/sg/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)

2.2.6.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Für die FACS-Analyse wurden bei der Organentnahme drei Achtel einer Niere verwendet und, ebenso wie die ganze Niere, gewogen. Nach der Zerkleinerung der Dreiachtel-Niere mit einem Skalpell wurde das Gewebe für 30 Minuten bei 37°C einem Verdau mit Kollagenase in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, 1mg/ml) zugeführt. Sodann wurde das Gewebe durch einen Cell Strainer mit einer Netzgröße von 70µm gedrückt und 6 Minuten lang bei 4°C und 1400rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific), abgesaugt und in 1ml PBS resuspendiert. Das Durchdrücken der Suspension durch einen weiteren, 40µm messenden Cell Strainer resultierte in der Gewinnung einer Einzelzellsuspension. Diese wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert und bis auf ca. 100µl abgesaugt. Nun erfolgte die extrazelluläre Färbung mit folgenden Antikörpern:

- antiCD45, gekoppelt mit FITC; Konzentration: 0,005mg/ml
- antiCD11b, gekoppelt mit PE; Konzentration: 0,002mg/ml
- antiH2Kb, gekoppelt mit PECy7; Konzentration: 0,002mg/ml

Jede Probe inkubierte zusammen mit 10µl eines Mastermixes, der jeden der Antikörper in der oben angegebenen Konzentration enthielt, für 20 Minuten bei 4°C in Dunkelheit, ehe die Zugabe von 4ml PBS das Labeling abstoppte. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen, Absaugen des Überstandes und Resuspension wurden für 20 Minuten 150µl Cytofix/Cytoperm hinzugefügt, um die Zellen zu fixieren und ihre Membranen zu permeabilisieren. Nach Abstoppen der Inkubation mit 4ml Saponinlösung (Konzentration: 1mg/ml, in PBS gelöst) wurde nochmals zentrifugiert und abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe des Antikörpers gegen Kollagen Typ I (je 10µl mit einer Konzentration von 0,001mg/ml), der durch die vorangegangene Permeabilisation der Zellmembranen in den

Intrazellulärraum wandern und dort befindliches Kollagen bzw. Prokollagen markieren konnte. Für die UUO-Nieren wurde zusätzlich eine Isotyp-Kontrolle (selbe Konzentration) angesetzt und ebenso wie die Kollagen-Färbung nach 50 Minuten mit Saponinlösung abgestoppt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden jeweils 10µl Streptavidin hinzugefügt, das mit dem Fluoreszenzstoff APC konjugiert war. Streptavidin bindet an Biotin und damit auch an die biotinylierten Kollagen- und Isotypantikörper, sodass Kollagen sekundär mit APC markiert wurde. 4ml Saponinlösung beendeten die Inkubation nach 30 Minuten. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand bis auf etwa 100µl abgesaugt und das entstandene Zell-Pellet resuspendiert. Jede Probe erhielt einen Zusatz von 20µl Counting Beads.

Die Messung der Zellen erfolgte mit dem FACS Canto II von BD. Die Ergebnisse wurden mit der FACSDiva Software ausgewertet. Die gewählte Gatingstrategie ist in Abb. 2.5 dargestellt. Anhand der Zahl der durchflusszytometrisch erfassten Beads zeigte sich, wie groß der Anteil der gemessenen Events an der Gesamtheit der in der Probe befindlichen Events war. Mithilfe folgender Formel lässt sich berechnen, wie viele Events einer bestimmten Zellpopulation in

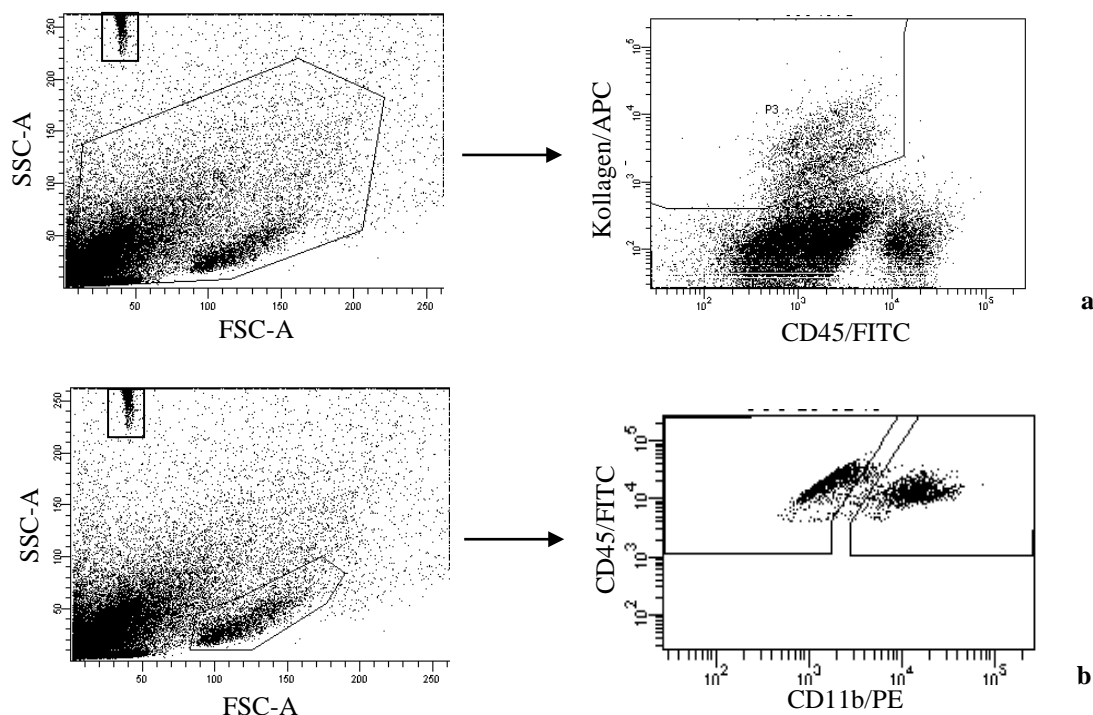


Abb. 2.5 FACS Gatingstrategie. Die aufgezeichneten Events wurden zunächst in einem Blot SSC-A gegen FSC-A aufgetragen. Dabei werden die Counting-Beads in einer kleinen Population links oben sichtbar. **a** Im SSC-A/FSC-A-Blot wird ein großzügiges Gate für alle Leukozyten gesetzt, die nicht allzu groß oder allzu klein sind. Die darin enthaltenen Events werden in einem Blot Kollagen gegen CD45 aufgetragen. Eine Kollagen⁺/CD45⁻ Population zeichnet sich ab. **b** Im SSC-A/FSC-A-Blot wird die Lymphozyten-Population erfasst und in einem CD45/CD11b-Blot aufgetragen. Darin lassen sich die CD45⁺CD11b⁻ und CD45⁺CD11b⁺ Populationen abgrenzen.

der ganzen Probe bzw. dem ganzen Organ vorkommen:

*Gesamtzahl der Zellen im Organ = (Zahl der gemessenen Events/Zahl der Beads) x
eingesetztes Volumen der Beads x Bead-Count x Kehrrbruch des eingesetzten Organanteils*

Also beim vorliegenden Vorgehen:

*Gesamtzahl der Zellen im Organ = Zahl der Events/Zahl der Beads x 20 x Bead-Count x 8/3
bzw. (Gewicht der gesamten Niere/Gewicht der 3/8-Niere).*

2.2.7 Histologie

2.2.7.1 Anfertigen histologischer Schnitte in Paraffin

Die Mikroskopie gewährt einen anschaulichen Blick auf die Mikrostruktur von Geweben und ggf. auf pathologische Veränderungen und die Ablagerung von Proteinen. Um histologische Schnitte anfertigen zu können, wurde bei der Organentnahme ein Viertel jeder Niere zur Konservierung in Formaldehydlösung eingelegt. Auf die Entwässerung der Proben im Institut für Pathologie (Uniklinikum Regensburg) folgte die Einbettung in Paraffin. Mit einem Mikrotom (pfm Medical, Köln) konnten 2-3µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen werden. Die Schnitte trockneten vor der weiteren Bearbeitung für 2 Tage bei 37°C.

Um die Schnitte in wässrigen Lösungen färben zu können, ist die Entfernung des unpolaren Paraffins aus dem fixierten Gewebe nötig. Dies geschieht in der Regel durch die Inkubation der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Nach dem Färbvorgang wird der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder mit unpolaren Medien kompatibel gemacht und für die Haltbarmachung mit einem geeigneten Medium eingedeckt.

2.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

2.2.7.1.1 Allgemeines Prinzip

Die H.E.-Färbung ist eine sehr häufig verwendete Färbemethode, die viele Strukturen im histologischen Präparat gut erkennbar werden lässt. Der Farbstoff Hämatoxylin bindet dabei an basophile Strukturen, wie zum Beispiel Zellkerne und Ribosomen, und erscheint blau-violett. Eosin hingegen bindet an azidophile (eosinophile) Strukturen wie Zytoplasma-Proteine und Mitochondrien und hat eine intensive rote Farbe.

2.2.7.1.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die getrockneten Paraffin-Schnitte verweilten 15 Minuten lang in Roti-Histol, bevor die Präparate im Zuge einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend bei 100%igem Ethanol, gewässert wurden. Nach der letzten Inkubation in 70%igem Ethanol wurden die Schnitte gründlich mit Aqua dest. gespült. Danach tauchten die Schnitte 5 Minuten lang in frisch filtrierter Hämalanlösung nach Mayer ein, wurden kurz mit Aqua dest. gespült, um überschüssige Farbe zu entfernen, und anschließend für 10 Minuten unter warmem, fließendem Leitungswasser gebläut. Erst nach der pH-Wert-Erhöhung durch das Leitungswasser erscheint die typische bläuliche Farbe des Hämatoxylins.

Nach erneutem kurzen Spülen mit Aqua dest. verblieben die Schnitte für 1-2 Minuten in einer wässrigen Eosin-Lösung. Überschüssige Farbe wurde wiederum abgewaschen, bevor die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100%) entwässert wurden. Nach 15-minütiger Inkubation in Roti-Histol konnten die Schnitte mit Roti-Histokitt eingedeckt werden. Die Präparate trockneten für mindestens zwei Tage, bis sie unter dem Lichtmikroskop ausgewertet wurden.

Die Auswertung unterlag einem eigens entwickelten Scoring-System für Nierenpräparate nach UUO. Dabei wurden verschiedene morphologische Aspekte der Präparate mit Punktwerten von 0 bis 3 Punkten beurteilt (s. Tab. 21).

Betrachtet wurden einerseits die glomerulären Strukturen im Präparat. Einzelne Glomeruli wurden nach der Offenheit der glomerulären Kapillaren sowie der mesangialen Proliferation bewertet. 0 Punkte entsprachen offenen Kapillaren mit keiner oder sehr geringer mesangialer Proliferation, 3 Punkte dagegen starker Proliferation mit einem erheblichen oder sogar vollständigen Verschluss der Kapillarlumina (29). Die Effekte bedingen sich morphologisch gegenseitig, da vermehrtes Mesangium die Kapillaren einzuengen scheint und kollabierte Kapillaren optisch das Mesangium hervortreten lassen. Die beiden Kriterien wurden daher zu einer Beurteilungskategorie zusammengefasst.

Ebenfalls beurteilt wurde der Bowman'sche Kapselraum je nach seiner Weite. Je enger der Raum war, desto höher war auch der zugeteilte Punktwert.

Mithilfe des Programms AxioVision wurden zudem bestimmte Strukturen im Präparat ausgemessen. Dazu gehörte der fibrotische Randsaum, der sich nach UUO rund um die Bowman'sche Kapsel bildet. Die Dicke des Saumes wurde an drei Stellen je Glomerulum gemessen, und zwar soweit möglich an drei Stellen, die drei Pole des Glomerulums abdecken. Der vierte Pol wird meist durch den Gefäßpol des Glomerulums bestimmt und ist daher eher ungeeignet für die Messung. Aus den drei Messwerten wurde ein Mittelwert berechnet und

diesem ein Punktwert zugewiesen. Je dicker der fibrotische Saum, umso höher war der Punktwert.

Auf ähnliche Weise ermittelte sich die Dicke der distalen Tubuli im Nierenkortex. Im Zuge der Nierenfibrose und der chronischen mechanischen Belastung durch den Harnstau atrophieren die Tubuluszellen und werden flacher. Für die Messung wurden quer angeschnittene Tubuli durch ein gedankliches Fadenkreuz in vier Quadranten eingeteilt. Aus drei der Quadranten wurden repräsentative Zellen ausgewählt, um ihre Höhe zu vermessen. Der Zellkern dieser Zellen musste deutlich angeschnitten sein, um zu gewährleisten, dass die Zelle nicht lediglich in einem eventuell ohnehin niedrigeren Randbereich getroffen war. Gemessen wurde die Strecke zwischen der Mitte der Basalseite und der Mitte der Apikalseite der Zelle. Dem Mittelwert der drei Messwerte wurde ein Punktwert zugewiesen, der umso höher war, je dünner die Zellen im Schnitt waren. Für die Messungen konnten nicht willkürlich unterschiedliche Tubulusabschnitte ausgewählt werden, da diese sich bereits unter physiologischen Bedingungen in ihrer Dicke deutlich voneinander unterscheiden (6). Daher wurden bewusst nur distale Tubuli gemessen. Sie weisen im Gegensatz zu proximalen Tubuli deutlicher abgrenzbare Zellgrenzen und Tubuluslumina auf, was die Messung vereinfacht.

Kriterien	Punkte
Kapillarschlingen und Mesangium	
Weite Kapillaren, wenige mesangiale Zellen und wenig EZM	0
Leicht verengte Kapillaren, leicht proliferierendes Mesangium	1
Stark verengte Kapillaren, viele mesangiale Zellen, viel EZM	2
Kapillarlumina nicht mehr erkennbar	3
Bowman'scher Kapselraum	
Über die ganze Zirkumferenz weiter Kapselraum (ausgenommen Gefäßpol)	0
Stellenweise oder über die ganze Zirkumferenz verengter Kapselraum	1
Kapselraum stellenweise nicht mehr erkennbar	2
Kapselraum vollständig von Glomerulumschlingen ausgefüllt	3
Fibrotischer Saum um die Bowman'sche Kapsel (Dicke)	
< 1,2 µm	0
1,2µm – 1,6µm	1
1,6µm – 2,0µm	2
> 2,0µm	3
Distale Tubuli (Dicke)	
> 12,5µm	0
11µm - 12,5µm	1
9,5µm – 11µm	2
< 9,5µm	3

Tab. 22 **Punkteverteilung im Scoring-System für die H.E.-Färbung.**

Im Detail gestaltete sich die Punktevergabe wie in Tab. 22 dargestellt und in Abb. 2.6 bis 2.8 veranschaulicht. Je Schnitt wurden 15 Glomeruli, 10-15 fibrotische Säume um die Bowman'sche Kapsel und 10-15 distale Tubuli zur Beurteilung herangezogen.

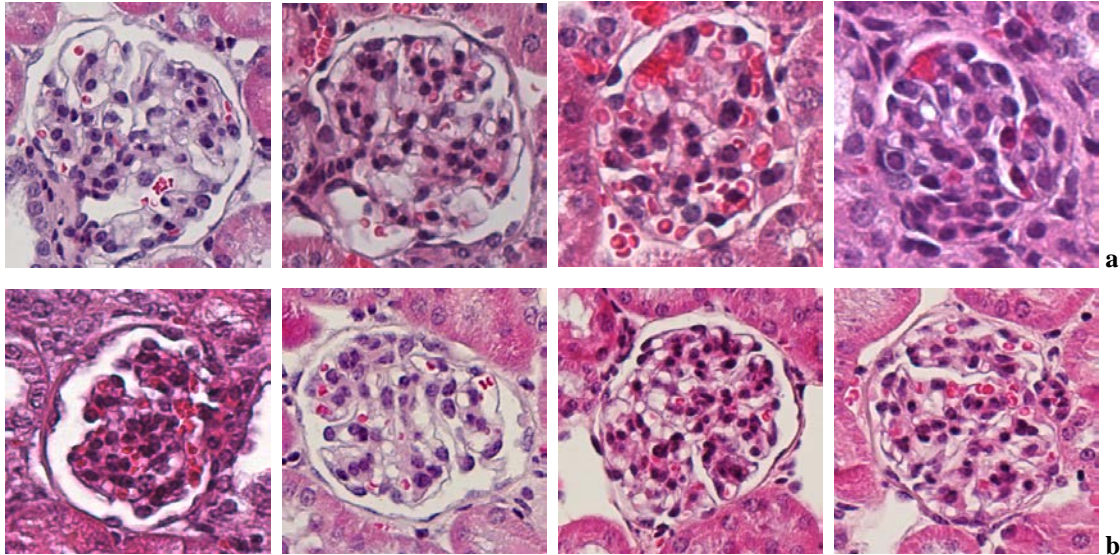


Abb. 2.6 **Beispiele zur Beurteilung von Glomeruli in der H.E.-Färbung.** **a** Die Kapillaren des Glomerulums werden nach ihrer Offenheit beurteilt. Je enger die Kapillarlumina sind und je mehr glomeruläre EZM zu sehen ist, umso höher ist der dem Glomerulum zugeordnete Punktwert. Das linke Glomerulum hat weit offene Kapillaren und verfügt nur in der Nähe des Gefäßpols über etwas EZM. Es erhält 0 Punkte. Die anderen Glomeruli weisen der Reihe nach immer engere und vereinzeltere Kapillarlumina (teilweise mit Erythrozyten gefüllt) sowie mehr EZM auf und erhalten demnach der Reihe nach 1, 2 bzw. 3 Punkte. **b** Die aufgeführten Glomeruli erhalten bezogen auf die Weite ihres Bowman'schen Kapselraums von links nach rechts aufsteigend 0 bis 3 Punkte. Der Kapselraum des linken Glomerulums ist erweitert. Beim zweiten Glomerulum ist er normal bis leicht verengt, beim dritten stark verengt und stellenweise nicht mehr vorhanden. Das letzte Glomerulum füllt die Bowman'sche Kapsel vollständig aus.

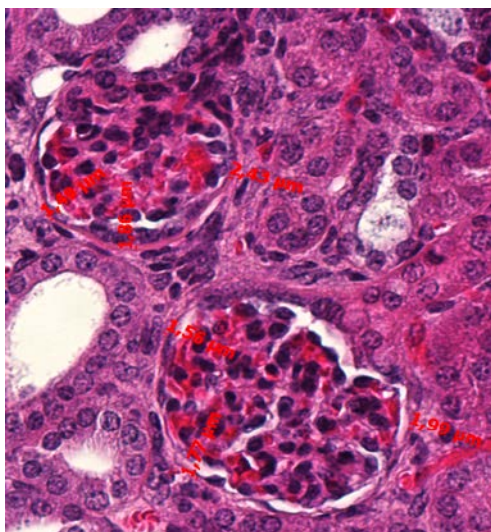


Abb. 2.7 **Beurteilung des periglomerulären fibrotischen Saumes in der H.E.-Färbung.** In den UUO-Nieren werden die meisten Glomeruli von einem hellrosa fibrotischen Saum umgeben. Die Dicke dieses fibrotischen Saumes wird an drei Stellen je Glomerulum gemessen (Beispielwerte sind rot eingetragen). Dem Mittelwert dieser drei Werte wird ein Punktwert von 0 bis 3 zugewiesen. Je höher der Mittelwert ist, umso höher ist auch der Punktwert.

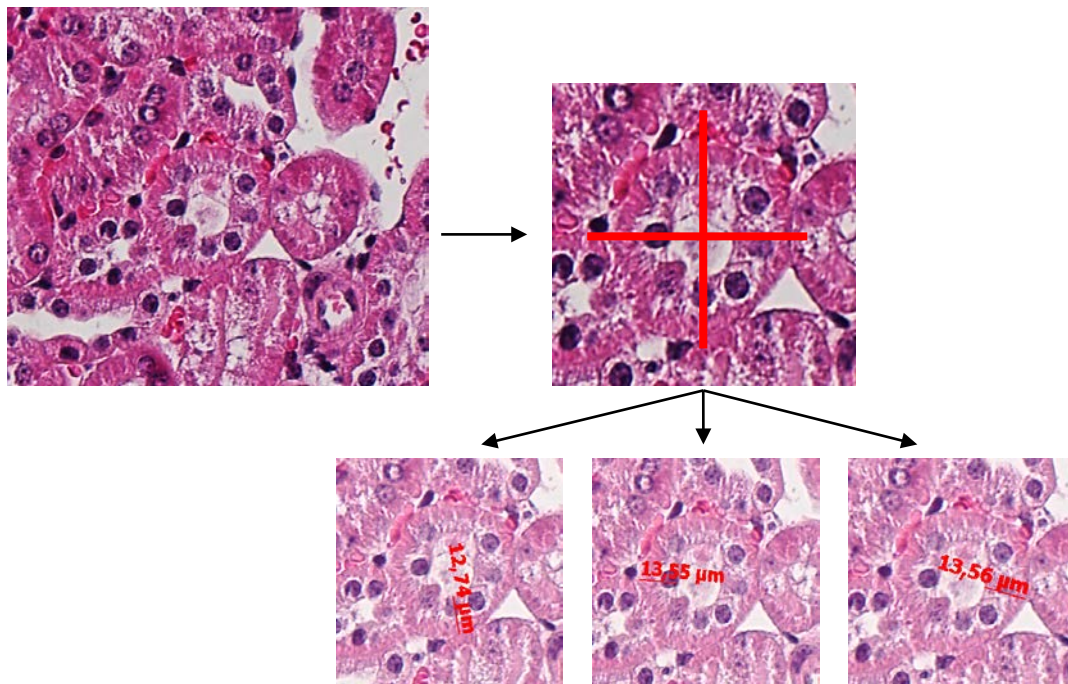


Abb. 2.8 **Beurteilung der distalen Tubuli in der H.E.-Färbung.** Es werden nur die distalen Tubuli betrachtet, die sich in der gesunden Niere dadurch auszeichnen, dass ihre Zellen basal eosinophil und apikal blass sind. Ihre Zellkerne befinden sich eher apikal. Wenn ein solcher distaler Tubulus im Querschnitt entdeckt wurde, wird er gedanklich durch ein Fadenkreuz in vier Quadranten eingeteilt. Für jeden Tubulus werden repräsentativ drei Zellen gemessen. Um das Ergebnis objektiver zu machen, müssen die drei ausgewählten Zellen stets einen komplett angeschnittenen Zellkern aufweisen und aus drei verschiedenen Quadranten stammen. Die Dicke der Zellen wird ermittelt, indem die Strecke zwischen dem Mittelpunkt der basalen Membran und dem Mittelpunkt der apikalen Membran gemessen wird. Dem Mittelwert der drei so erhaltenen Werte wird ein Punktwert von 0 bis 3 zugewiesen. Je geringer der Mittelwert ist, d. h. je atropher der Tubulus ist, desto höher ist der Punktwert.

2.2.7.3 Masson-Trichrom-Färbung

2.2.7.3.1 Allgemeines Prinzip

Die Masson-Trichrom-Färbung wird genutzt, um Kollagen und andere Bindegewebsbestandteile deutlich abgrenzbar anzufärben. Die vorangehende Behandlung mit Formaldehyd-haltiger Beize sorgt für eine bessere Haftung der Farbstoffe auf den Schnitten. Weigerts Eisen-Hämatoxylin färbt die Zellkerne sehr dunkelblau bis schwarz an. Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin färbt das Cytoplasma rot ein. Sowohl Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäurelösung als auch Anilinblau werden benötigt, um Bindegewebefasern anzufärben, die dann hellblau erscheinen.

2.2.7.3.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die Paraffinschnitte wurden 15 Minuten lang in Roti-Histol inkubiert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und über Nacht in eine Beizelösung gestellt. Am nächsten Tag wurden sie sorgfältig mit Aqua dest. gespült, 5 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung (1 Teil Lösung A + 1 Teil Lösung B) getaucht und für 10 weitere Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach folgten Inkubationen für 5 Minuten in Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung, für 5 Minuten in Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäure-Lösung (1 Teil Phosphorwolframsäurelösung + 1 Teil Phosphormolybdänsäurelösung + 2 Teile Aqua dest.), 15 Minuten in Anilinblaulösung und 1 Minute in 1%iger Essigsäure. Auf jeden Inkubationsschritt hin wurden die Schnitte mehrmals mit Aqua dest. gespült, bis das Wasser sich nicht mehr färbte. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe und 5-minütiger Inkubation in Roti-Histol wurden die Präparate mit dem Roti-Histokitt eingedeckt und zum Trocknen liegen gelassen.

Für die Auswertung wurden unter 200-facher Vergrößerung von jedem Präparat 10-12 sich nicht überlappende Bilder aufgenommen (Software: Carl Zeiss AxioVision Rel.4.8.1). Mit dem Programm MetaMorph ließ sich ermitteln, wie groß der Anteil der fibrotischen Fläche (%) jedes Bildes war, die sich hellblau darstellte. Für jedes Präparat wurden Mittelwerte aus den jeweiligen Gesichtsfeldern berechnet.

2.2.8 Immunhistologie

2.2.8.1 Anfertigen histologischer Schnitte in Kryokonservierung

Am Tag der Organentnahme wurde je ein Viertel der entnommenen Nieren in Tissue Tek O.C.T. compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff zur Lagerung bei -80°C tiefgefroren. Bei -20°C erfolgte in einem Kryotom die weitere Verarbeitung zu 2-3µm dicken Schnitten sowie das Aufziehen auf Objektträger. Die Schnitte trockneten 2 Tage lang bei Raumtemperatur, ehe sie 10 Minuten lang in eisgekühltem Aceton fixiert und zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren wurden.

2.2.8.2 Färbungen für Kollagen und α -SMA

2.2.8.2.1 Allgemeines Prinzip

Bei der Immunhistologie werden gezielt im Gewebe vorkommende Antigene mit dagegen gerichteten Antikörpern markiert. Um unter dem Mikroskop ein sichtbares Signal zu erhalten, werden an die F_c-Fragmente der Primärantikörper Sekundärantikörper gebunden, die mit einem Farbstoff konjugiert sind. Auch andere Systeme mit primär gelabelten Antikörpern oder Enzymkomplexen sind gebräuchlich.

Unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper werden beispielsweise mit SuperBlock-Lösung geblockt. Zur Vermeidung unerwünschter Reaktionen des Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers mit endogener Peroxidase und damit unspezifischer Hintergrundfärbung kann die endogene Peroxidase beispielsweise mit Wasserstoffperoxid geblockt werden (28). Um sich besser im Präparat zurecht zu finden oder um nachzuweisen, dass positiv markierte Stellen tatsächlich innerhalb des Gewebeschnittes liegen, werden die Zellkerne im Präparat angefärbt. Dies kann beispielsweise mit DAPI erfolgen, einem Fluoreszenzstoff, der an DNA bindet und in diesem gebundenen Zustand Licht im blauen Wellenlängenbereich emittiert.

2.2.8.2.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Die bei -20°C gelagerten Kryoschnitte wurden aufgetaut und kurz angetrocknet. Dann wurden sie in PBS gewaschen und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit SuperBlock-Lösung inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte für über Nacht die Zugabe der Primärantikörper: der Antikörper gegen Kollagen Typ I in einer Verdünnung von 1:700 oder der Antikörper gegen α -SMA in einer Verdünnung von 1:500. Der Antikörper-gekoppelte Farbstoff Alexa-Fluor 594 wurde nach einem weiteren Waschschrift in einer Verdünnung von 1:500 auf die Schnitte gegeben. Alexa-Fluor 594 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert.

Um die Zellkerne anzufärben, fand das Eindeckmedium Fluoromount G Verwendung, das DAPI enthält.

Von den fertigen Präparaten wurden etwa 10-12 sich nicht überlappende Bilder in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Mit MetaMorph konnte der prozentuale Anteil der Fläche ermittelt werden, der positiv für Kollagen bzw. α -SMA war. Für jedes Präparat wurde ein Mittelwert gebildet.

2.2.8.3 Färbung für Fibronectin

2.2.8.3.1 Allgemeines Prinzip

Das Prinzip funktioniert wie unter 2.2.8.2.1 beschrieben. Da für die Fibronectin-Färbung Paraffin- und nicht Kryoschnitte verwendet wurden, ist zusätzlich zu erwähnen, dass manche Epitope, denen bei der Fixierung mit Formaldehyd eine Denaturierung widerfährt, nach einer Behandlung mit geeigneten Puffern oder Proteasen wieder besser erkennbar für die Primärantikörper werden (28).

2.2.8.3.2 Praktische Durchführung und Auswertestrategie

Für die Fibronectin-Färbung wurden Paraffinschnitte in Roti-Histol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Danach verweilten die Schnitte für 30 Minuten in einem 1%igen Pepsin-Puffer, der auf eine Temperatur von 37°C und mit Salzsäure auf einen pH von 2,0 eingestellt wurde. Sodann erfolgten Waschschrte in Aqua dest. und in PBS sowie eine 30-minütige Inkubation in SuperBlock. Der Primärantikörper für Fibronectin wurde in einer Verdünnung von 1:500 auf die Schnitte pipettiert und über Nacht inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden am folgenden Tag mit PBS abgewaschen und der mit Alexa-Fluor 594 konjugierte Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation und einem Waschschrte folgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI, das im Eindeckmedium Fluoromount G enthalten war.

Von den fertigen Präparaten wurden etwa 10-12 sich nicht überlappende Bilder in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Mit MetaMorph wurde der prozentuale Anteil der Fläche ermittelt, der positiv für Fibronectin war.

2.2.9 Statistische Auswertung

Aufgezeichnete Rohdaten wurden in ein Microsoft Excel-Format exportiert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden aus den Rohdaten berechnete Werte in das Programm GraphPad Prism 5 kopiert, um daraus Grafiken zu erstellen. Für einzelne Versuchsgruppen berechnete Mittelwerte wurden als arithmetisches Mittel \pm Standard Error of the Mean (SEM) dargestellt. Um einen möglichen Unterschied zwischen jeweiligen Versuchsgruppen auf seine Signifikanz hin zu überprüfen, wurde mit GraphPad Prism 5 ein einseitiger, ungepaarter T-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von 0,05 angenommen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Intraperitoneale Applikation von Tamoxifen

3.1.1 Versuchsanordnung

Um die Wirksamkeit der intraperitonealen Applikation von Tamoxifen im Hinblick auf den induzierbaren Kollagen-Knockout zu testen, wurde männlichen Mäusen, die zu Beginn des Versuchs etwa 15 Wochen alt waren, an vier von sieben aufeinander folgenden Tagen Tamoxifen in Olivenöl injiziert (s. Abb. 3.1). Die Konzentration betrug 10mg Tamoxifen pro 1ml Öl. Sieben Tage nach der letzten Tamoxifengabe wurde die UUO durchgeführt, um eine Nierenfibrose herbeizuführen, deren Analyse sieben Tage später erfolgte. Sowohl die fibrosierte als auch die kontralaterale, intakte Niere (KO-Niere) wurden entnommen und aufgearbeitet. Die Entnahme von Schwanzbiopsien fand an den Tagen 0 und 21 statt.

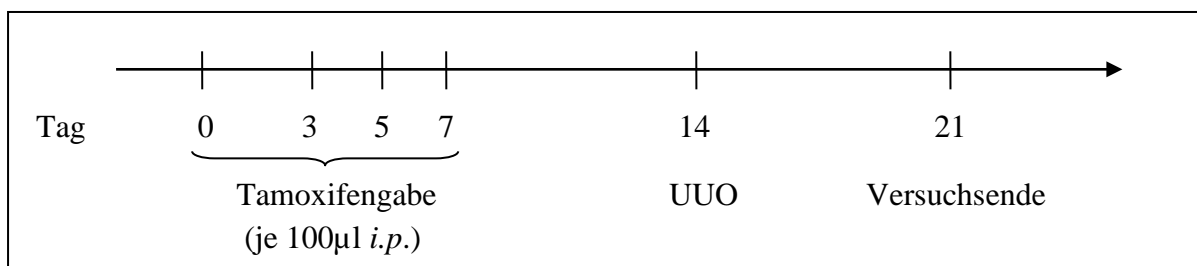


Abb. 3.1 **Versuchsaufbau für die intraperitoneale Applikation von Tamoxifen.** Jeweils 100µl des in Olivenöl gelösten Tamoxifen wurde den Versuchstieren an Tag 0, 3, 5 und 7 *i.p.* gespritzt. Die UUO fand an Tag 14 statt. An Tag 21, sieben Tage nach der Fibrose-induzierenden UUO, wurden der Versuch beendet und die beiden Nieren der Tiere entnommen. Schwanzbiopsien wurden an Tag 0 und an Tag 21 entnommen.

Verglichen wurden zwei Versuchsgruppen mit je sechs Tieren des Genotyps ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} bzw. ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} (Kontrollgruppe). Die Genotypen wurden mittels PCR und Gelelektrophorese der aus Schwanzbiopsien gewonnenen DNA verifiziert (s. Abb. 3.2).

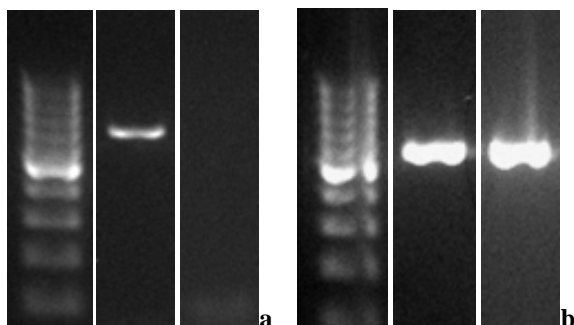


Abb. 3.2 **Genotypen der Versuchsgruppen.** DNA aus Schwanzbiopsien von Tag 0 diente zur Durchführung der PCR für das Cre/Flox-Konstrukt. Links wurde orientierend jeweils ein DNA-Ladder aufgetragen, dessen kräftigste Bande bei 500bp liegt. Die übrigen Banden liegen stets 100bp über- bzw. untereinander. **a** Im mittleren Bild ist bei 726bp die Bande für Cre zu erkennen, die bei allen ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tieren auftrat und bei keiner Maus aus der Kontrollgruppe (rechtes Bild).

b Bei allen Mäusen im Versuch trat nach der PCR für Flox bei 569bp die Bande auf, die ein homozygotes Vorliegen der in das Kollagen Typ I-Gen eingebauten Flox-Sequenzen anzeigt. Mittig ein beispielhaftes Bild aus der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Gruppe, rechts ein Bild aus der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Gruppe.

3.1.2 Rekombination des Kollagen Typ I-Gens nach Applikation von Tamoxifen *i.p.*

Neben der Genotypisierung auf ERT2-Cre und die Flox-Schnittstellen wurde auch eine PCR für das Kollagen-Gen (Col1a1-Gen) durchgeführt, deren Design wie bereits beschrieben (s. Kap. 1.6.3 und 2.2.3) so gestaltet war, dass nach einer Rekombination dieses Gens eine PCR-Bande bei 746bp erschien. Die analysierte DNA wurde aus zweizeitig abgenommenen Schwanzbiopsien gewonnen, wobei der erste Zeitpunkt an Tag 0, also vor der ersten Tamoxifengabe, und der zweite Zeitpunkt an Tag 21, dem Tag des Versuchsendes, lag. Wie zu erwarten, zeigten sich vor der Gabe von Tamoxifen bei keiner der Versuchsgruppen Banden bei 746bp. Das Kollagen-Gen war bei allen Tieren in seiner vollständigen Form im Genom enthalten. Die Bande bei 4227bp, die in diesem Fall auftritt, konnte jedoch meist nur schemenhaft erkannt werden, da das verwendete PCR-Kit für DNA-Produkte dieser Länge ungeeignet ist.

Die Schwanzbiopsien von Tag 21 wiesen ein anderes Ergebnis auf. Die Proben der ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}-Tiere waren aufgrund des fehlenden ERT2-Cre negativ für die Bande bei 746bp, bei den ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Tieren trat sie dagegen deutlich in Erscheinung. Zusätzlich wurde DNA aus den Nieren der Versuchstiere isoliert. Auch in diesen Proben war bei den ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Tieren, und nur bei den Tieren dieser Versuchsgruppe, die Bande bei 746bp positiv (s. Abb. 3.3). Damit konnte davon ausgegangen werden, dass durch die Applikation von Tamoxifen die Rekombination im Gewebe der ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse und insbesondere auch im Nierengewebe stattgefunden hatte. Mithilfe weiterer Methoden sollte im Folgenden auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden, wie stark die stattgehabte Rekombination sich auf die Expression des Kollagens in einer Provokations-situation wie der UUO auswirkte.

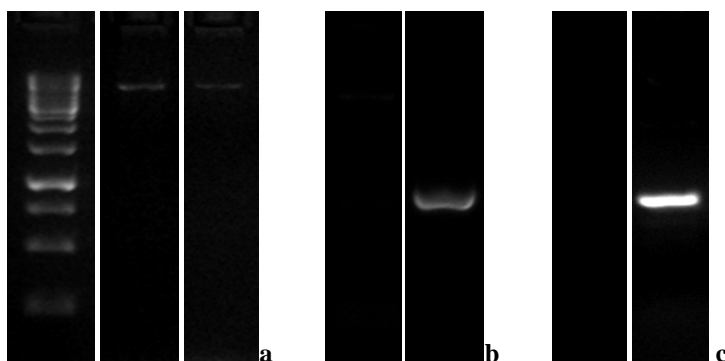


Abb. 3.3 Die *i.p.* Applikation von Tamoxifen induziert die Rekombination des Kollagen-Gens. Ganz links ein DNA-Ladder, dessen kräftigste Bande bei 1000bp und die Bande darunter bei 750bp liegt. **a** Vor der Gabe von Tamoxifen an Tag 0 lag in der DNA aus den Schwanzbiopsien in beiden Versuchsgruppen ausschließlich die intakte Form des Kollagen-Gens vor, erkennbar an der sich schwach

abzeichnenden Bande bei 4227bp. Die Bande bei 746bp war negativ. **b** Nach der Gabe von Tamoxifen tauchte die 746bp-Bande in der DNA der Schwanzbiopsien von Tag 21 bei allen ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäusen auf (rechts), blieb aber in der Kontrollgruppe (ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}) negativ (links). **c** Auch in der aus den Nieren gewonnenen DNA war die 746bp-Bande als Indikator für eine (teil-)erfolgreiche Rekombination in den ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäusen positiv (rechts) im Gegenteil zur Kontrollgruppe (links).

3.1.3 Auswirkung der Rekombination auf die mRNA nach Tamoxifen *i.p.*

Um darzustellen, wie sich die Rekombination des Kollagen-Gens auf die Expression der mRNA auswirkt, wurde aus den Nieren der Versuchstiere mRNA isoliert und nach einer reversen Transkription mittels qPCR quantifiziert. Wie in Abb. 3.4 dargestellt ist, enthielten die KO-Nieren lediglich ein niedriges Basislevel an *Kollagen Typ I*-mRNA. Durch die induzierte Fibrose stieg dieser Wert im Vergleich zu den KO-Nieren in den UUO-Nieren stark an, auch in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse. Ihr Gehalt an *Kollagen Typ I*-mRNA war zwar tendenziell geringer als derjenige in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Gleichzeitig wurde eine qPCR für das mit Kollagen assoziierte Strukturprotein Fibronectin durchgeführt. Auch hinsichtlich der *Fibronectin*-mRNA wiesen die KO-Nieren einen deutlich niedrigeren mRNA-Gehalt auf als die UUO-Nieren. Des Weiteren war zu erkennen, dass in

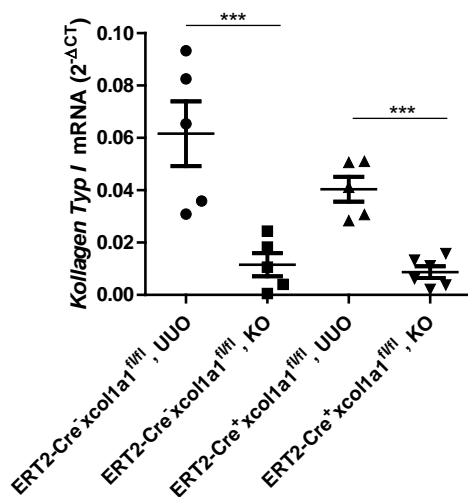


Abb. 3.4 **Reduzierte Expression von *Kollagen Typ I* – mRNA nach einem partiellen Kollagen-Knockout durch *i.p.* Tamoxifenapplikation.** Die qPCR für *Kollagen Typ I*-mRNA zeigte, dass die kontralateralen Nieren (KO) nur sehr wenig Kollagen exprimierten. In den UUO-Nieren war wesentlich mehr *Kollagen Typ I*-mRNA enthalten. Der quantitative Unterschied zwischen *Kollagen Typ I*-mRNA in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse und den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse war nicht signifikant. (n = 5-6; ***: p < 0,001; ±SEM)

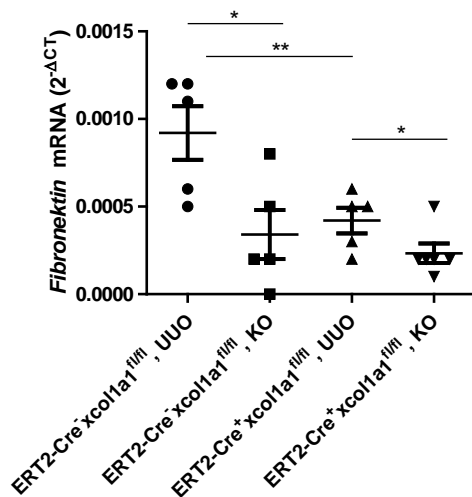


Abb. 3.5 **Signifikante Reduktion der *Fibronectin*-mRNA-Expression in ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl} -Tieren nach *i.p.* Tamoxifenapplikation.** Per qPCR wurde die mRNA für Fibronectin quantitativ in den entnommenen Nieren nachgewiesen. Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl} -Mäuse enthielten hochsignifikant weniger *Fibronectin*-mRNA als die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x *coll1a1*^{fl/fl} -Mäuse. (n = 6; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ± SEM)

Den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Tiere signifikant weniger mRNA für Fibronektin enthalten war als in den UUO-Nieren der Kontrolltiere (s. Abb. 3.5).

3.1.4 Einfluss des partiellen Kollagen-Knockouts auf die intrazelluläre Expression von Kollagen und die Leukozyteninfiltration in den UUO-Nieren nach Tamoxifen *i.p.*

Um weitere Informationen über die Auswirkungen des Kollagen-Knockouts zu gewinnen, wurden am Tag des Versuchsendes drei Achtel des Nierengewebes für die FACS-Analyse aufgearbeitet (s. Kap. 2.2.6). Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern für CD45 (FITC), CD11b (PE), H2kb (PE-Cy7) und intrazelluläres Kollagen bzw. einen dazugehörigen Isotypen (APC) gefärbt. Die im FACS aufgezeichneten

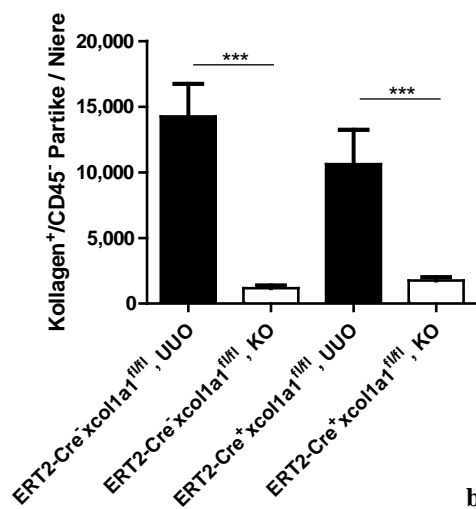
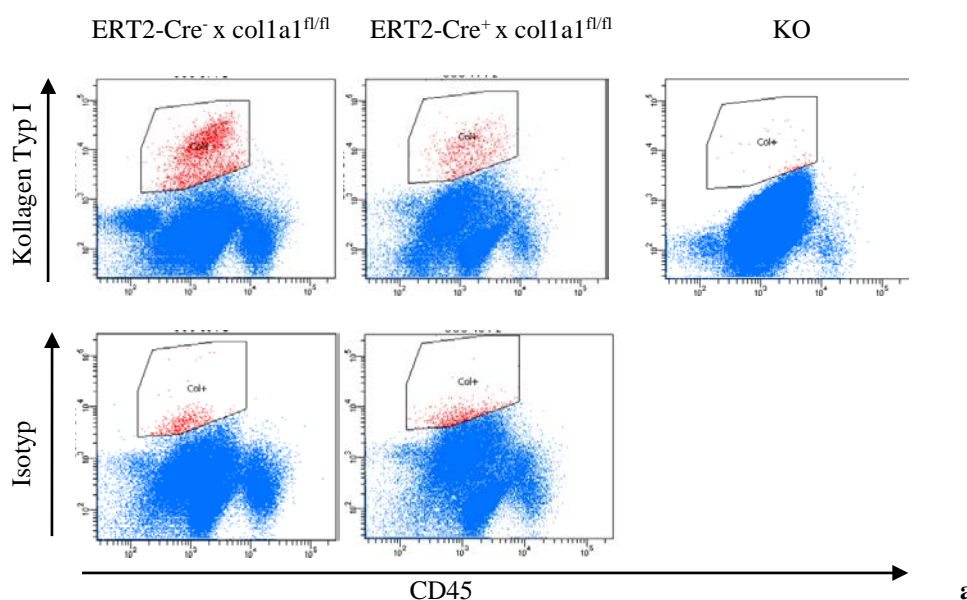


Abb. 3.6 Reduktion von intrazellulärem Kollagen in CD45⁺ Zellen aus UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse nach *i.p.* Applikation von Tamoxifen. a Exemplarische Dot Blots der Nieren im FACS.

In der oberen Zeile sind die Färbungen für Kollagen Typ I aufgetragen, unten die dazugehörigen Isotyp-Kontrollen. Die ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse zeigten tendenziell mehr Kollagen-positive Events in den UUO-Nieren als die ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse. Die Isotypkontrolle (untere Zeile) war größtenteils negativ. Ganz rechts ist die Kollagenfärbung einer KO-Niere zu sehen, die erwartungsgemäß nur sehr wenige Kollagen-positive Events enthielt.

b Darstellung der Kollagen⁺/CD45⁺ Partikel pro Niere. Der leichte Unterschied in der Kollagenexpression

zwischen den UUO-Nieren der beiden Gruppen war nicht signifikant. Die KO-Nieren exprimierten nur sehr wenig Kollagen. (n = 6; ***: p < 0,001; ± SEM)

Events wurden gegatet und ausgezählt wie unter 2.2.6 beschrieben.

Als Kollagen-produzierende Zellen wurden solche Events aufgefasst, die eine bestimmte Mindestgröße überschritten und positiv für Kollagen Typ I, aber negativ für CD45 waren. Darüber hinaus wurden CD45-positive Zellen ausgewertet, also Zellen hämatopoietischen Ursprungs, die im Zuge des ausgelösten Entzündungsprozesses in die Nieren eingewandert waren. Sie wurden nochmals unterschieden in CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen. Im Vergleich der zwei Versuchsgruppen zeigte sich, dass die beiden letzteren Zellpopulationen in den ligierten Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse in deutlich geringeren Mengen vorkamen als in den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tieren und damit auf eine verminderte entzündungsbedingte Lymphozyteninfiltration hinwiesen (s. Abb. 3.7).

Der Blick auf die Kollagen-positiven Zellen war weniger eindeutig. Zwar wiesen die Nieren der Knockout-Tiere weniger Kollagen-positive Events auf als die Kontrollen, allerdings war dieser Unterschied ähnlich zu den Ergebnissen der qPCR nur gering ausgeprägt und nicht signifikant (s. Abb. 3.6).

Nach der Analyse der *Kollagen Typ I*-mRNA und des intrazellulären Kollagens sollte nun

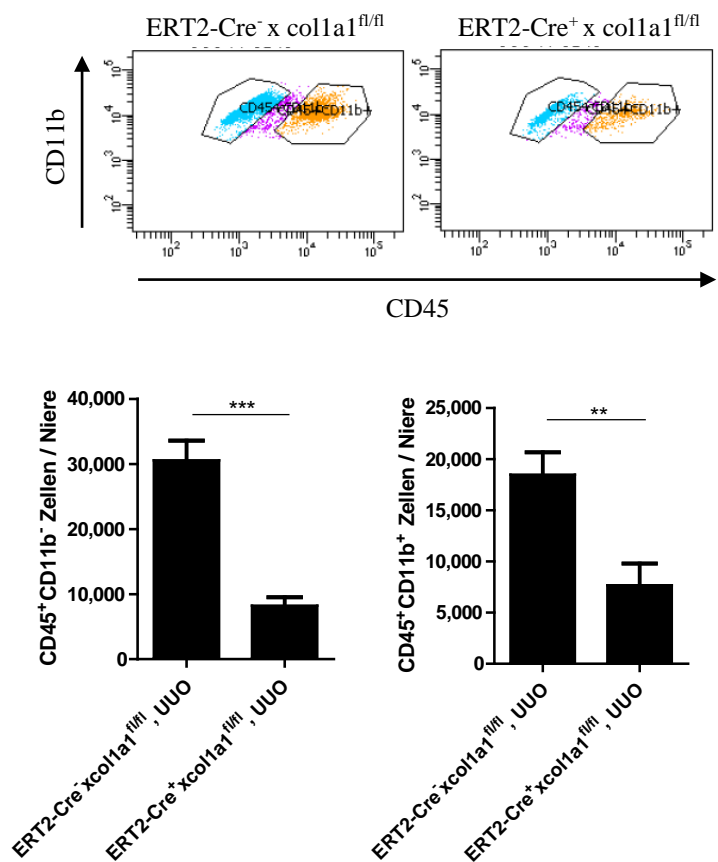


Abb. 3.7 Rückgang der Gewebeinfiltration mit CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse.

a Beispielhafte FACS-Blots für die CD45/CD11b-Färbung der UUO-Nieren. **b** Die Auswertung der im FACS für CD45 und CD11b gelabelten Events zeigte, dass sowohl die CD45⁺/CD11b⁻ als auch die CD45⁺/CD11b⁺ Zellen in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere im Vergleich zu den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tieren in hochsignifikant erniedrigter Zahl vorkamen. (n = 6; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

noch ein Augenmerk auf das extrazellulär im Gewebe abgelagerte Kollagen gelegt werden. Dies geschah mithilfe der Histologie und Immunhistologie, wie im Folgenden beschrieben wird.

3.1.5 Auswirkungen des partiellen Kollagen-Knockouts mit Tamoxifen *i.p.* auf histologisch und immunhistologisch nachweisbare Proteinablagerungen

Es wurden verschiedene histologische und immunhistologische Färbungen durchgeführt, um die im Gewebe abgelagerten Strukturproteine wie unter 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben zu quantifizieren.

Mithilfe der Masson-Trichrom-Färbung wurde zunächst das gesamte abgelagerte Bindegewebe beurteilt. Interstitielles Bindegewebe spielt in der physiologischen Niere kaum eine Rolle und konnte dementsprechend in den kaum beeinträchtigten KO-Nieren nur in sehr geringen Mengen detektiert werden. In UUO-Nieren dagegen lagern sich meist gut abgrenzbare, in der Masson-Trichrom-Färbung bläulich eingefärbte Bindegewebestränge ins intertubuläre Interstitium, in den paravasalen Raum und rund um die Glomeruli ab.

Der quantitative Unterschied an eingelagertem Bindegewebe in den UUO-Nieren erwies sich zwischen den Versuchsgruppen nach der *i.p.* Gabe des Tamoxifen jedoch als marginal und

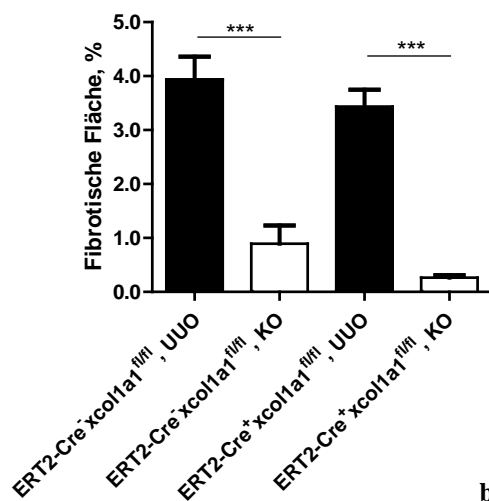
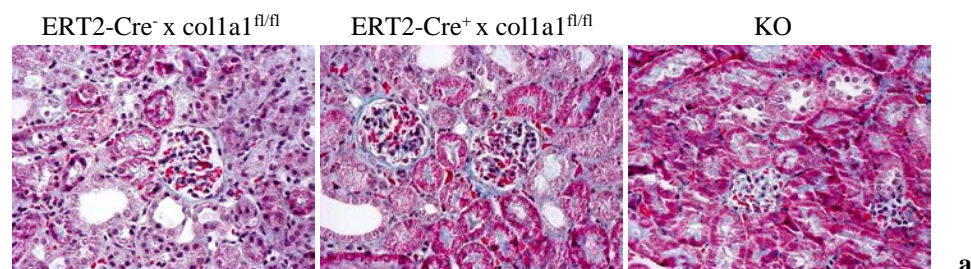


Abb. 3.8 Die *i.p.* Applikation von Tamoxifen hat keinen signifikanten Effekt auf die Bindegewebeinlagerung in die Niere nach UUO. **a** Beispielbilder aus den UUO-Nieren der beiden Versuchsgruppen bzw. aus einer KO-Niere in 40-facher Vergrößerung. **b** Die Grafik veranschaulicht das Ergebnis der quantitativen Auswertung der fibrotischen Fläche in den Gewebeschnitten, die unter den UUO-Nieren keinen signifikanten Unterschied erbrachte. Die KO-Nieren enthielten nur sehr wenig Bindegewebe. (n = 6; ***: p < 0,001; ± SEM)

nicht signifikant, wie in Abb. 3.8 zu sehen ist.

Da die Masson-Trichrom-Färbung viele verschiedene Bindegewebsproteine anfärbt, stellt sie allerdings keine sehr spezifische Untersuchung für die Effektivität eines Kollagen Typ I-Knockouts dar. Um Kollagen Typ I spezifisch, also gesondert von den übrigen nach der UUO eingelagerten Bindegewebsproteinen, darstellen und auswerten zu können, wurde eine gegen Kollagen Typ I gerichtete Immunhistologie durchgeführt.

In den KO-Nieren konnte hierbei in der Regel kaum Kollagen Typ I nachgewiesen werden. In den fibrotischen UUO-Nieren dagegen war das rote Signal des Alexa-Fluor594-Sekundärantikörpers deutlich zu detektieren. In Abb. 3.9 ist anhand von Beispielbildern zu erkennen, wie sich die Kollagenfibrillen in der Immunhistologie darstellten. Die ermittelte prozentuale Fläche, die das abgelagerte Kollagen Typ I auf den Gewebeschnitten der UUO-Nieren einnahm, lag bei den Knockout-Tieren nur knapp unter dem Niveau der ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse. (s. Abb. 3.9).

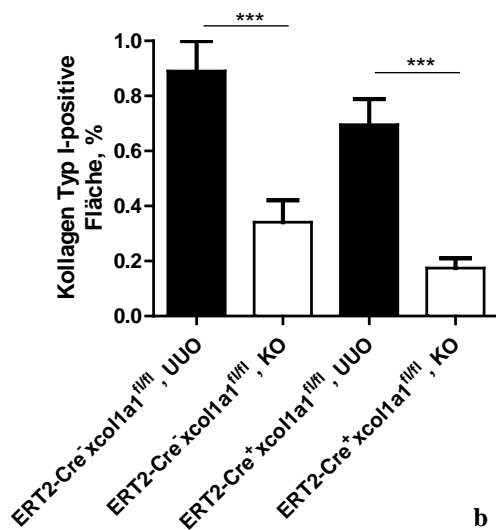
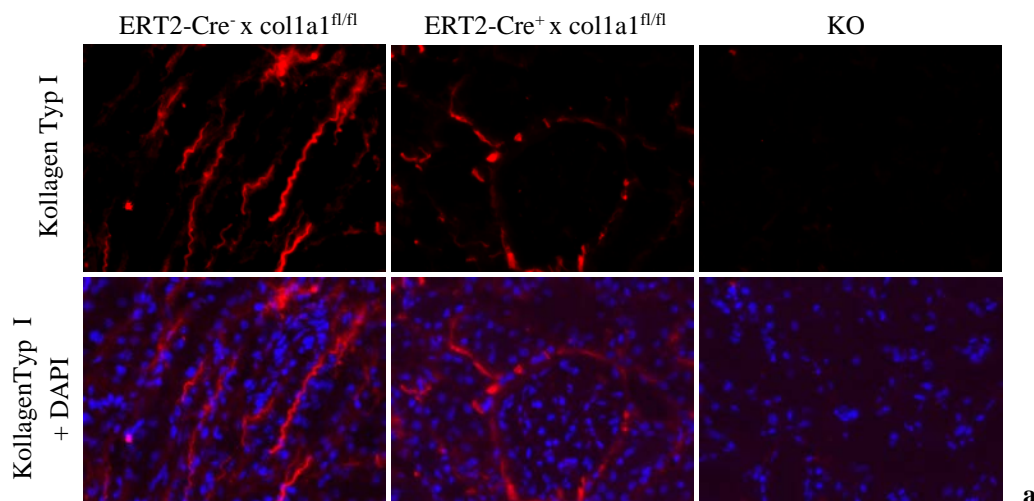


Abb. 3.9 Geringe Auswirkung von Tamoxifen *i.p.* auf Kollagen Typ I- Einlagerungen in der Niere.

a Immunhistologie in den UUO- bzw. KO-Nieren gegen Kollagen Typ I mit dem rot fluoreszierenden Alexa594-Farbstoff, die Zellkerne blau fluoreszierend mit DAPI gefärbt (untere Bildreihe), 40-fache Vergrößerung. **b** Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}-Gruppe lagerten tendenziell mehr Kollagen ein als die Nieren der Knockout-Tiere (ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}). Die quantitative Auswertung zeigte jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant war. (n = 6; ***: p < 0,001; ± SEM)

Neben Kollagen wurde auch das Strukturprotein Fibronektin immunhistologisch angefärbt. Die prozentuale Fläche, auf der Fibronektin im Gewebe nachgewiesen werden konnte, war in den UUO-Nieren weit größer als in den KO-Nieren. Die ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Mäuse wiesen tendenziell niedrigere Werte in den UUO-Nieren auf als die ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Mäuse (s. Abb. 3.10).

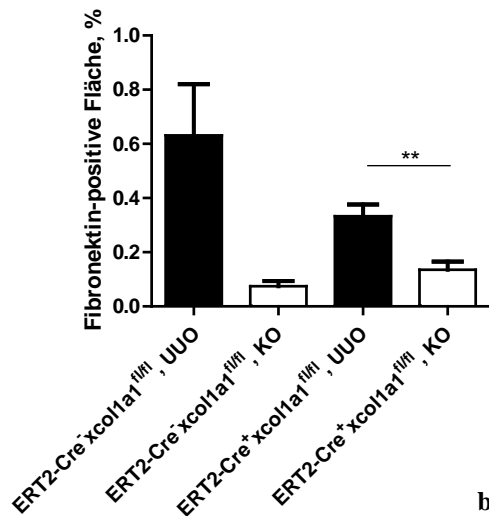
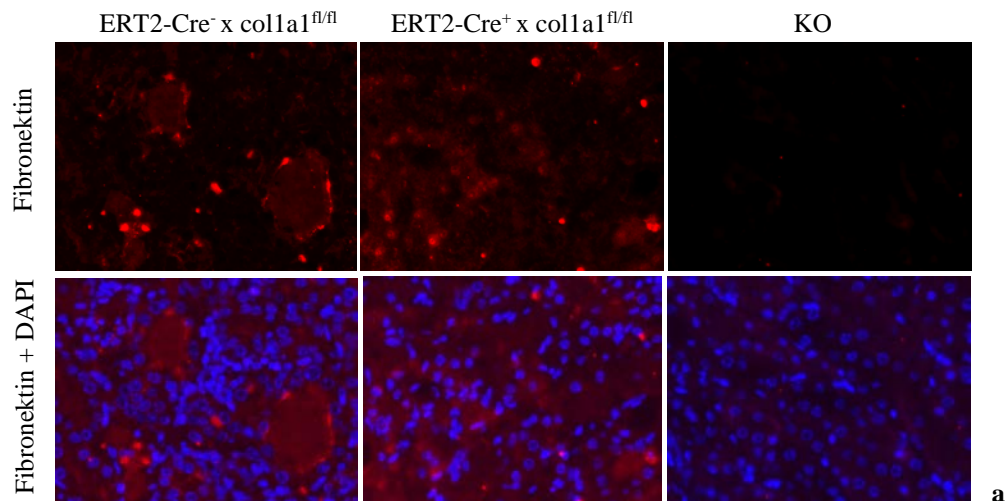


Abb 3.10 Die *i.p.* Applikation von Tamoxifen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Fibronektin nach der UUO. **a** Fibronektin in den UUO- bzw. KO-Nieren in Rot, die Zellkerne in Blau, 40-fache Vergrößerung. **b** Obwohl aus der Grafik klar ersichtlich zu sein scheint, dass die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere weniger Fibronektin enthielten als die Nieren der ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere, ist der Unterschied aufgrund der hohen Varianz in der Kontrollgruppe nicht signifikant. (n = 6; **: p < 0,01; ± SEM)

Schließlich wurde α -SMA angefärbt, das als Marker für Kollagen-produzierende Myofibroblasten diente. In den KO-Nieren blieb die α -SMA-positive Fläche sehr gering, ähnlich der Nieren in einem physiologischen Zustand. Erst unter der UUO als fibrosierendem Stimulus erhöhte sich der α -SMA-positive Flächenanteil, da sich im Zuge der Nierenschädigung vermutlich unterschiedliche Zelltypen zu Myofibroblasten differenzierten. Wie Abb. 3.11 veranschaulicht, zeigten sich die Werte der UUO-Nieren für beide Versuchsgruppen annähernd gleich.

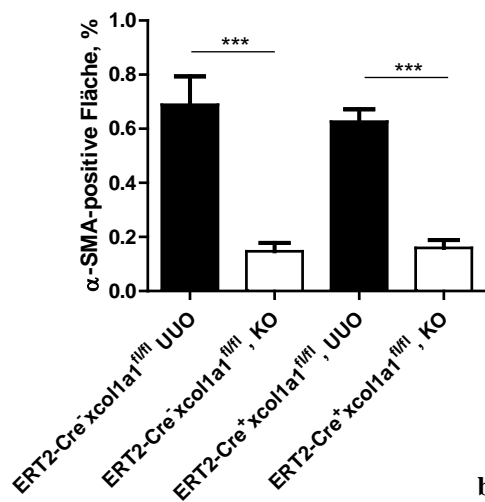
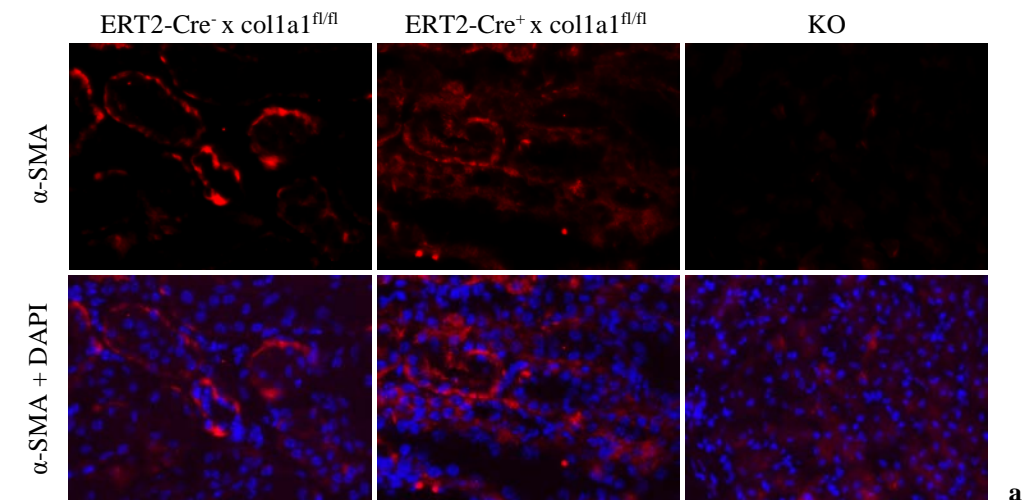


Abb. 3.11 **Kein Unterschied der α -SMA-positiven Fläche in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}- und der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere nach *i.p.* Applikation von Tamoxifen. a** Immunhistologie gegen α -SMA in den UUO- bzw. KO-Nieren in Rot, die Zellkerne in Blau, 40-fache Vergrößerung. **b** Während in den KO-Nieren nur sehr wenig α -SMA nachgewiesen werden konnte, kam es in den UUO-Nieren zu einer starken Einlagerung von α -SMA. Zwischen den UUO-Nieren der beiden Versuchsgruppen bestand in dieser Hinsicht kein Unterschied. (n = 6; ***: p < 0,001; \pm SEM)

Diese Daten zeigen, dass die *i.p.* Applikation von Tamoxifen im oben vorgestellten Schema keine relevante Reduktion der Expression von Kollagen Typ I bei induzierbaren Knockout-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}) erzielen konnte. Aus diesem Grund erfolgte die Testung einer anderen Applikationsform von Tamoxifen.

3.2 Applikation von Tamoxifen über Medizinalfutter

3.2.1 Tamoxifenapplikation über Medizinalfutter im 4+1-Wochenschema

3.2.1.1 Versuchsanordnung

Statt wie zuvor intraperitoneal wurde den Mäusen in der neuen Versuchsanordnung das Tamoxifen mittels eines Medizinalfutters verabreicht, das Tamoxifen in einer Konzentration von 400mg/kg Futter enthielt. Das Futter verfügte darüber hinaus über alle notwendigen Nährstoffe, sodass im Zeitraum der Tamoxifenapplikation keine anderweitige Zufütterung erfolgen musste.

Kurz vor Beginn des Versuchs wurden für die Genotypisierung der Tiere Schwanzbiopsien abgenommen. Wie Abb. 3.12 zu entnehmen ist, erfolgte die Gabe des Tamoxifen-Medizinalfutters an die Mäuse vier Wochen lang *ad libitum*. Davor und danach erhielten die Versuchstiere die im Tierlabor übliche Standarddiät. Nach dem Absetzen des Medizinalfutters folgte eine Frist von einer Woche bis zur UUO, um das Versuchsergebnis nicht durch mögliche Stressreaktionen, die durch das Tamoxifen-haltige Futter an sich oder durch das Umstellen des Futters hervorgerufen worden sein könnten, zu beeinflussen. Parallel zur UUO wurden weitere Schwanzbiopsien entnommen. Das Versuchsende erfolgte samt Entnahme beider Nieren sowie letztmalig einer Schwanzbiopsie sieben Tage nach der UUO.

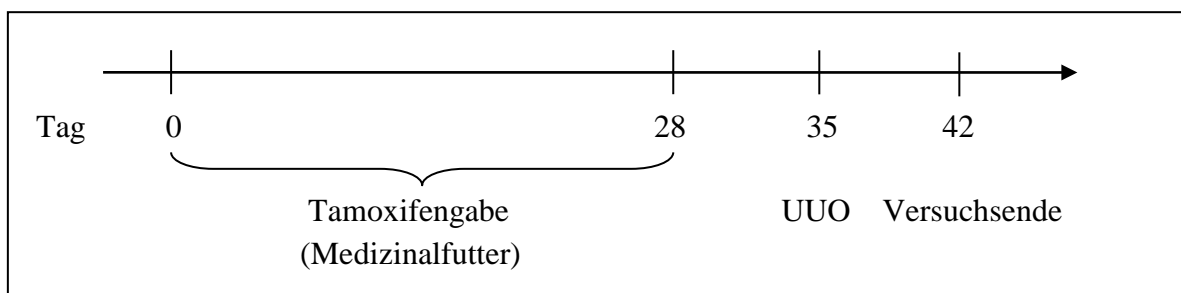


Abb. 3.12 Versuchsaufbau für das 4+1-Schema zur Applikation von Tamoxifen über Medizinalfutter. Die Mäuse erhielten vier Wochen lang Medizinalfutter mit Tamoxifen, um den Kollagen-Knockout in den ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren zu induzieren (Tag 0 bis 28). Danach wurde auf normales Futter umgestellt. An Tag 35 erfolgte die UUO. Eine Woche später, an Tag 42, wurde der Versuch unter Entnahme beider Nieren beendet. Schwanzbiopsien wurden an Tag 0, 28 und 42 abgenommen.

Für den Versuch wurden männliche und weibliche Tiere verwendet, die entweder den Genotyp ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl} oder ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl} (Kontrolltiere) aufwiesen. Ergänzend zur zentralen Frage, ob die Rekombination des Kollagen Typ I-Gens erfolgreich durch die Tamoxifenanwendung herbeigeführt wurde, sollte anhand des Versuchsaufbaus

betrachtet werden, ob das Alter der Mäuse eine Rolle für den Erfolg der Rekombination spielte. Daher war ein Teil der Mäuse zu Beginn des Versuchs etwa fünfzehn Wochen alt, während der andere Teil zu Beginn erst fünf Wochen alt war. Daraus ergaben sich vier Versuchsgruppen mit folgenden Eigenschaften:

- ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 15 Wochen alt, n = 10 (6 Männchen, 4 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 15 Wochen alt, n = 13 (7 Männchen, 6 Weibchen)
- ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, n = 6 (4 Männchen, 2 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, n = 8 (5 Männchen, 3 Weibchen)

Die Genotypen wurden, wie bereits unter 3.1.1 veranschaulicht, mittels PCR mit DNA aus Schwanzbiopsien verifiziert. Die PCR für Kollagen aus Schwanz- und Nierengewebe sollte den Nachweis für die erfolgreiche Rekombination liefern, wie im Folgenden dargestellt wird.

3.2.1.2 Rekombination des Kollagen Typ I-Gens nach vierwöchiger peroraler

Tamoxifenzufuhr

Die PCR für Kollagen Typ I wurde sowohl mit Schwanzbiopsien von Tag 0 als auch von Tag 42 durchgeführt. An Tag 0 war die Bande bei 746bp bei allen Versuchstieren negativ, d. h. in keiner der Proben lag die rekombinierte Form des Kollagen-Gens vor. An Tag 42 war die Bande bei den Mäusen des Genotyps ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} immer noch negativ, bei den

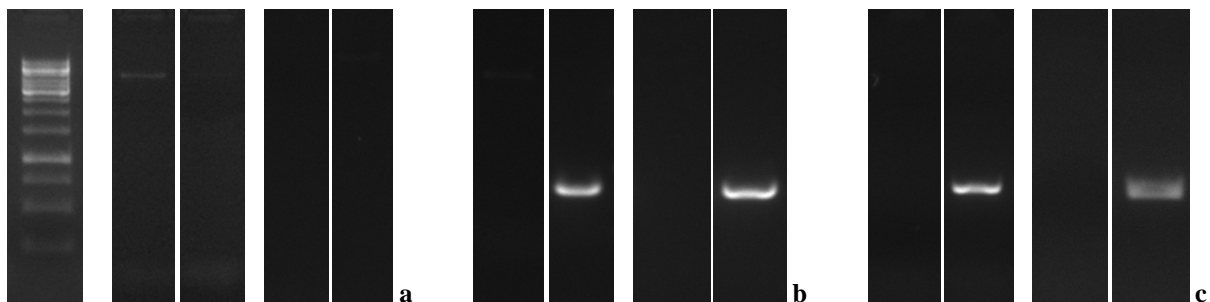


Abb. 3.13 **Die vierwöchige Gabe von Tamoxifen in Medizinalfutter führt in den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} - Mäusen zur Rekombination des Kollagen-Gens.** Eine Bande bei 746bp in der Kollagen-PCR zeigte die erfolgreiche Rekombination an. Dargestellt sind Bilder von der Gelelektrophorese, links jeweils vom Genotyp ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, rechts ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}. Ganz links ist zur Orientierung der bereits beschriebene DNA-Ladder aufgetragen (prominenteste Bande bei 1000bp). **a** Die Schwanzbiopsien von Tag 0 waren in allen vier Gruppen (Mäuse jeden Genotyps und jeden Anfangsalters) negativ für die 746bp-Bande. **b** An Tag 42 war das PCR-Produkt aus den Schwanzbiopsien der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere beider Altersgruppen positiv für die 746bp-Bande. Von links nach rechts ist aufgetragen: ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} mit dem Anfangsalter von 15 Wochen, ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} mit Anfangsalter 15 Wochen, ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} mit Anfangsalter 5 Wochen, ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} mit Anfangsalter 5 Wochen. **c** Auch die DNA aus den Nieren wies bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tieren die 746bp-Bande auf. Die Reihenfolge der Bilder ist dieselbe wie unter b.

ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tieren gleich welchen Alters jedoch positiv (s. Abb. 3.13). Wie bereits nach der *i.p.* Anwendung von Tamoxifen hatte die Rekombination des Kollagen Typ I-Gens in den ERT2-Cre-positiven Tieren zumindest zu einem gewissen Grad stattgefunden. Auch im Nierengewebe waren die 746bp-Banden nur bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tieren nachweisbar (s. Abb. 3.13c).

Mit DNA aus den Schwanzbiopsien von Tag 0, 35 und 42 wurde zudem jeweils die PCR für Flox durchgeführt und wie unter 2.2.3 beschrieben quantifiziert. Durch die Lagebeziehung zwischen den Primerbindestellen der PCR für Flox und den durch die Flox-Sequenzen definierten Schnittstellen für die ERT2-Cre-Rekombinase geht eine geglückte Rekombination des Gens stets mit dem Verlust einer Primerbindestelle für die Flox-PCR einher. An einer solchen Stelle kann die PCR keinen Anfangspunkt mehr finden, wodurch die Menge des PCR-Produkts für Flox sinken sollte, je mehr der zellulären Genome erfolgreich rekombiniert wurden.

Mit bloßem Auge war nach der Gelelektrophorese zu erkennen, dass dementsprechend die Banden des PCR-Produkts für Flox bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tieren nach der Applikation von Tamoxifen stark abblassten und in manchen Fällen auch bei langer Belichtungszeit unter UV-Licht fast unsichtbar blieben (vgl. Abb. 3.14 und 3.15). Nach der *i.p.* Tamoxifenapplikation war dieses Phänomen nicht beobachtet worden.

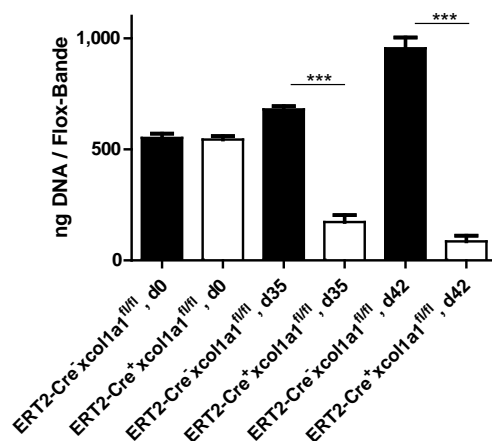
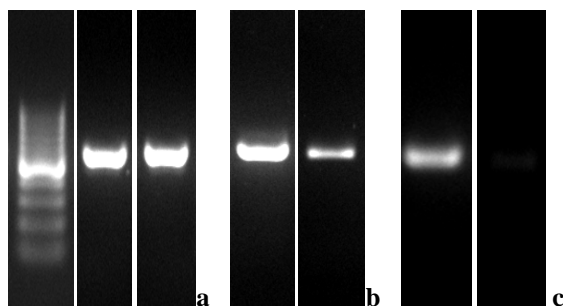


Abb. 3.14 **Abnahme der Intensität der Flox-Bande bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tieren mit einem Anfangsalter von 15 Wochen nach der Gabe von Tamoxifen.** Dargestellt ist das Verhalten der Banden der PCR für Flox aus den Schwanzbiopsien der beiden Versuchsgruppen nach Applikation von Tamoxifen. **a** Links der DNA-Ladder, in der Mitte die Flox-Bande der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Tiere, rechts die Bande der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere aus der Schwanzbiopsie von Tag 0. **b** Flox-Banden an Tag 35. Die rechte Bande gehört wiederum zu den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Mäusen und ist bereits deutlich schwächer ausgeprägt als die linke Bande. **c** Flox-Banden an Tag 42. Die Bande der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere (rechts) ist fast nicht mehr erkennbar. **d** Der optische Eindruck der Banden bestätigte sich in der quantitativen Auswertung. Die Menge an DNA war nach der vierwöchigen Gabe von Tamoxifen (Tag 35 und 42) in den Banden der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere hochsignifikant niedriger als in den Flox-Banden der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Tiere. (n = 10-13; ***: p < 0,001; ± SEM)

Um eine objektive Aussage über die Intensität der Banden treffen zu können, wurde die Intensität gemessen und mithilfe eines DNA-Ladders mit bekannten DNA-Mengen in die Menge des in den Banden enthaltenen PCR-Produkts in ng umgerechnet. In Abb. 3.14d und Abb. 3.15d ist zu sehen, dass die DNA-Menge für Flox an Tag 0 unter den Versuchsgruppen noch vergleichbar hoch war. An Tag 35 und Tag 42 dagegen hatte sich durch die Tamoxifen-induzierte Rekombination die DNA-Menge in den Banden der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren stark reduziert, während sie bei den ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren hoch blieb oder mit dem Alter der Tiere sogar weiter anstieg. Diese Entwicklung ließ sich in beiden Altersgruppen beobachten.

Ob die Rekombination dieses Mal Auswirkungen auf die Expression von Kollagen hatte, soll in den folgenden Unterpunkten dargestellt werden.

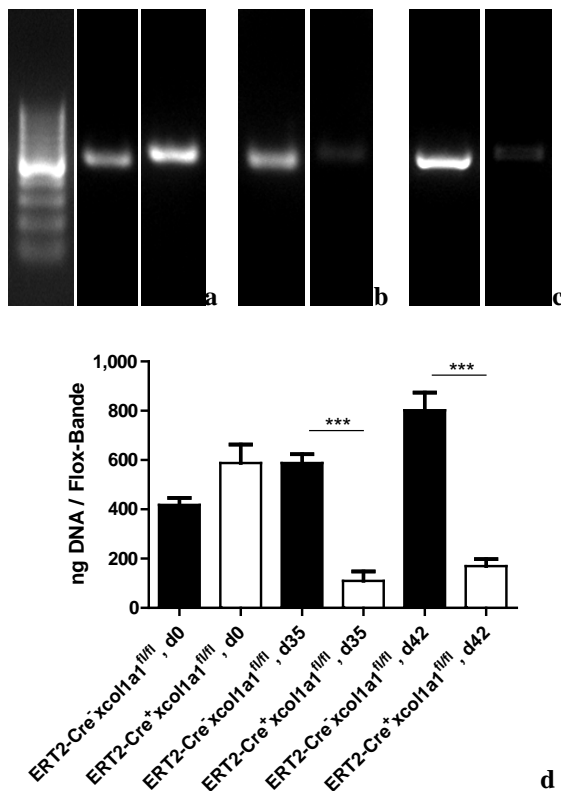


Abb. 3.15 **Die Intensität der Flox-Bande reduziert sich bei den ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren mit einem Anfangsalter von 5 Wochen nach der Gabe von Tamoxifen.** Dargestellt ist das Verhalten der Banden der PCR für Flox aus den Schwanzbiopsien der beiden Versuchsgruppen nach Applikation von Tamoxifen.

a Links der DNA-Ladder, in der Mitte die Flox-Bande der ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere, rechts die Bande der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere aus der Schwanzbiopsie von Tag 0. **b** Flox-Banden an Tag 35. Die rechte Bande gehört zu den ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Mäusen und ist deutlich schwächer als die linke Bande. **c** Flox-Banden an Tag 42. Die Bande der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere (rechts) ist schwächer als die Bande der Kontrolltiere. **d** Nach der quantitativen Auswertung zeigte sich, dass die Menge an DNA nach der Gabe von Tamoxifen (Tag 35 und 42) in den Banden der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere hochsignifikant niedriger war als in den Flox-Banden der Kontrolltiere. (n = 6-8; ***: p < 0,001; ± SEM)

3.2.1.3 Auswirkungen der Rekombination auf die mRNA nach vierwöchiger peroraler Tamoxifenzufuhr

Aus den entnommenen Nierenproben wurde mRNA isoliert und in cDNA überführt. Mit Primern für die Transkriptionsprodukte der Gene von Kollagen Typ I und Fibronectin wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Wie in Abb. 3.16 zu sehen ist, lag bei den älteren Versuchstieren die durchschnittliche Menge der *Kollagen Typ I*-mRNA in den UUO-Nieren

der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse nur leicht und nicht signifikant unter derjenigen der Kontrolltiere.

Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere, die zu Beginn des Versuchs erst fünf Wochen alt waren, enthielten dagegen signifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA als das Nierengewebe der gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere. Dies liefert einen Anhalt

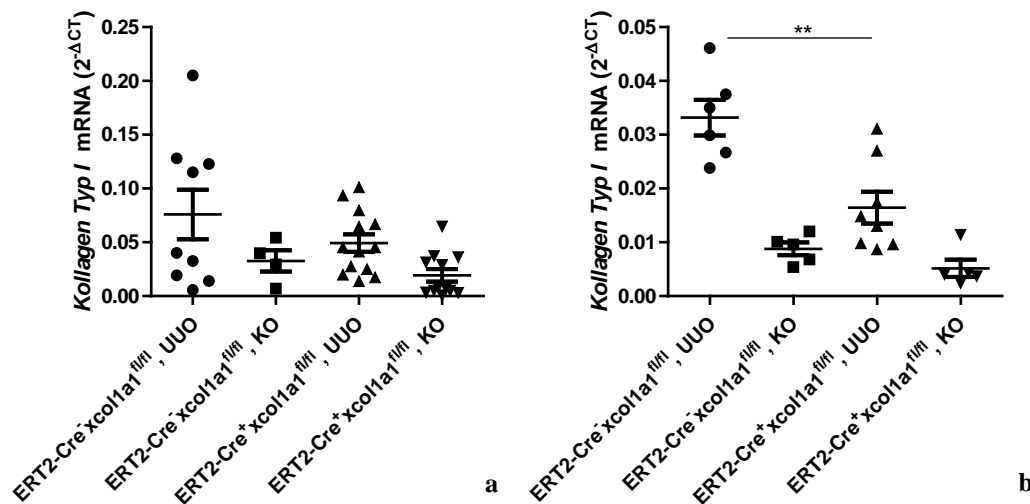


Abb. 3.16 **Verminderte *Kollagen Typ I*-mRNA nach vierwöchiger Gabe von Tamoxifen in ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäusen.** **a** Die UUO-Nieren der Knockout-Tiere, die zu Versuchsbeginn 15 Wochen alt waren, enthielten im Schnitt nur etwas weniger *Kollagen Typ I*-mRNA als die Nieren der gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere. **b** Die UUO-Nieren der zu Versuchsbeginn 5 Wochen alten ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse enthielten hochsignifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA als die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse. (n = 6-13; **: p < 0,01; ± SEM)

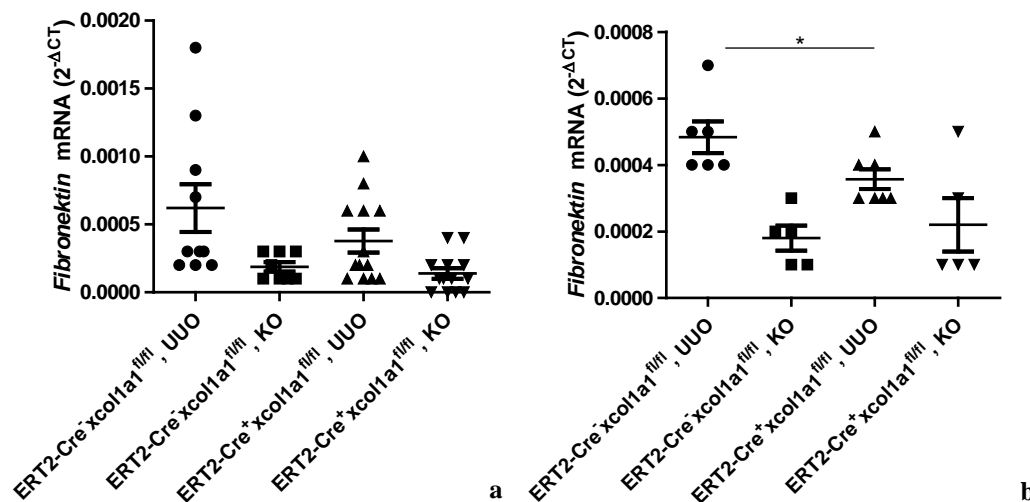


Abb. 3.17 **Unterschiede in der Expression von *Fibronektin*-mRNA in den UUO-Nieren beider Versuchsgruppen.** **a** Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere mit dem Anfangsalter von 15 Wochen enthielten nicht signifikant weniger *Fibronektin*-mRNA als die UUO-Nieren der gleichaltrigen Kontrolltiere. **b** Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere mit dem Anfangsalter von 5 Wochen enthielten signifikant weniger *Fibronektin*-mRNA als die UUO-Nieren der gleichaltrigen Kontrolltiere. (n = 6-13; *: p < 0,05; ± SEM)

dafür, dass der induzierte Knockout effektiver eintritt, wenn das Tamoxifen bereits in jüngerem Alter appliziert wird.

In Abb. 3.17 sind die Werte für die *Fibronektin*-mRNA aufgetragen. In beiden Altersgruppen wiesen die ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere in den UUO-Nieren niedrigere Werte auf als ihre jeweils gleichaltrigen Kontrolltiere. Zu beachten ist allerdings, dass die gemessenen Werte in den zu Beginn 5 Wochen alten Gruppen sehr niedrig sind und sich am unteren Rande der Messfähigkeit befinden. Die dort auftretende Signifikanz ist daher nicht sehr aussagekräftig.

Zusätzlich aufgetragen sind für jede Gruppe die gemessenen Werte für die KO-Nieren, die auf einem sehr niedrigen Basisniveau rangierten.

3.2.1.4 Rekombinationsfolgen in Form intrazellulärer Expression von Kollagen und Leukozyteninfiltration in den UUO-Nieren nach vierwöchiger peroraler Tamoxifengabe

Im FACS ließ sich beobachten, dass nach der vierwöchigen Applikation von Tamoxifen in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere wesentlich weniger Kollagen-produzierende Zellen detektabel waren als in den Nieren der ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Mäuse. In beiden Altersgruppen verringerte sich die Zahl der Kollagen-positiven Zellen in den Knockout-Mäusen auf einen Wert von nur noch maximal der Hälfte des Wertes der Kontrolltiere. Der Unterschied war jeweils hochsignifikant (s. Abb. 3.18).

Bei den älteren Tieren nahm in den Knockout-Mäusen auch die Zahl der in die UUO-Nieren infiltrierenden CD45⁺ Zellen ab. Sowohl die CD45⁺/CD11b⁻ als auch die CD45⁺/CD11b⁺ Zellen waren in den Nieren der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere signifikant seltener zu detektieren als in den ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Mäusen mit dem erhaltenen Kollagen Typ I-Gen.

In der Gruppe der jüngeren Mäusen glichen sich diese Unterschiede jedoch aus und oder kehrten sich im Falle der CD45⁺/CD11b⁺ Zellen sogar um (s. Abb. 3.19).

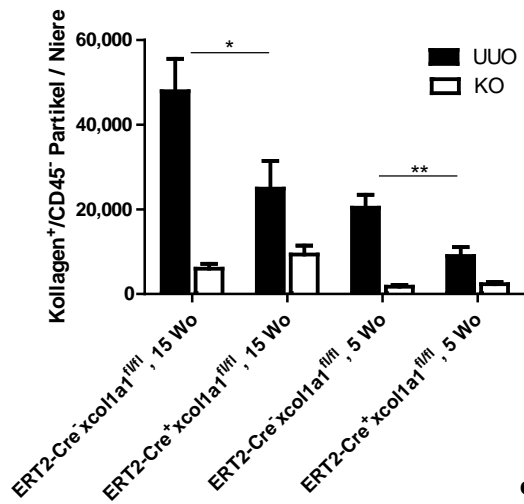
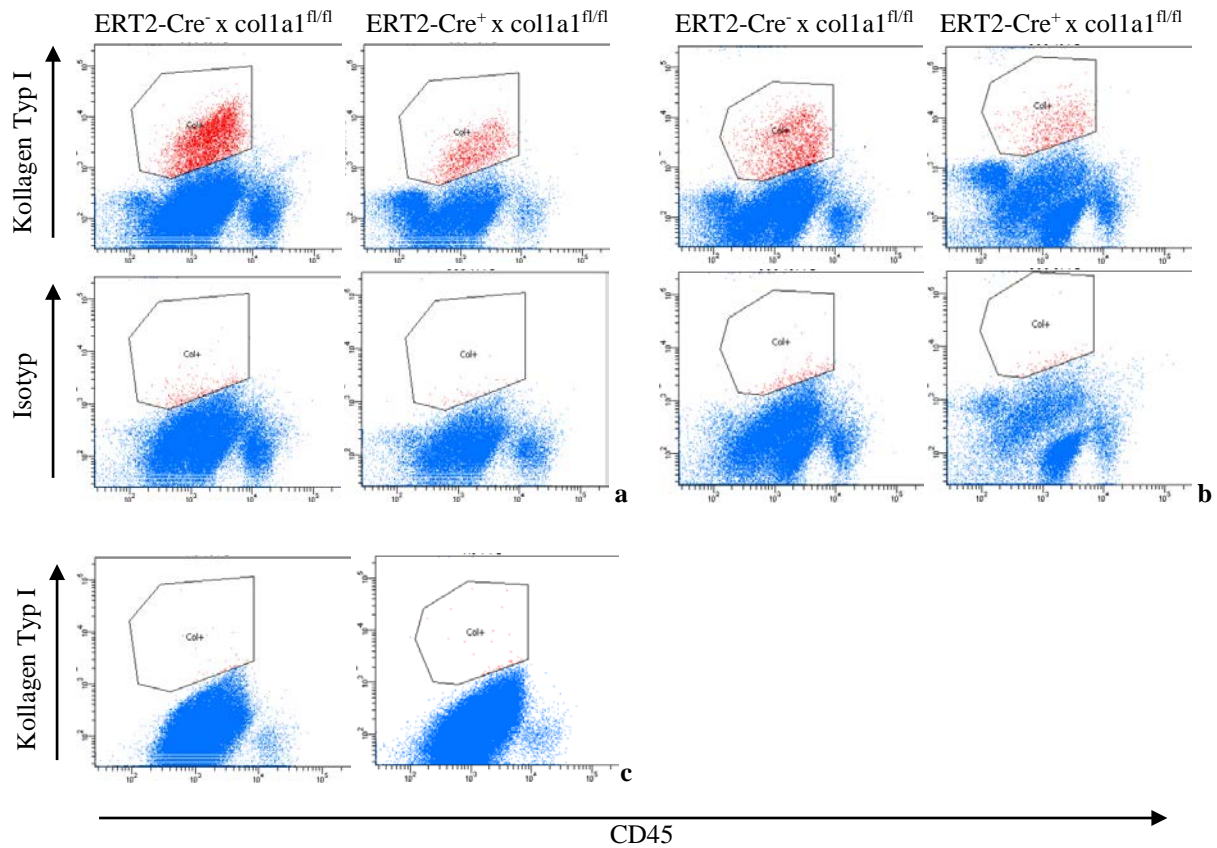
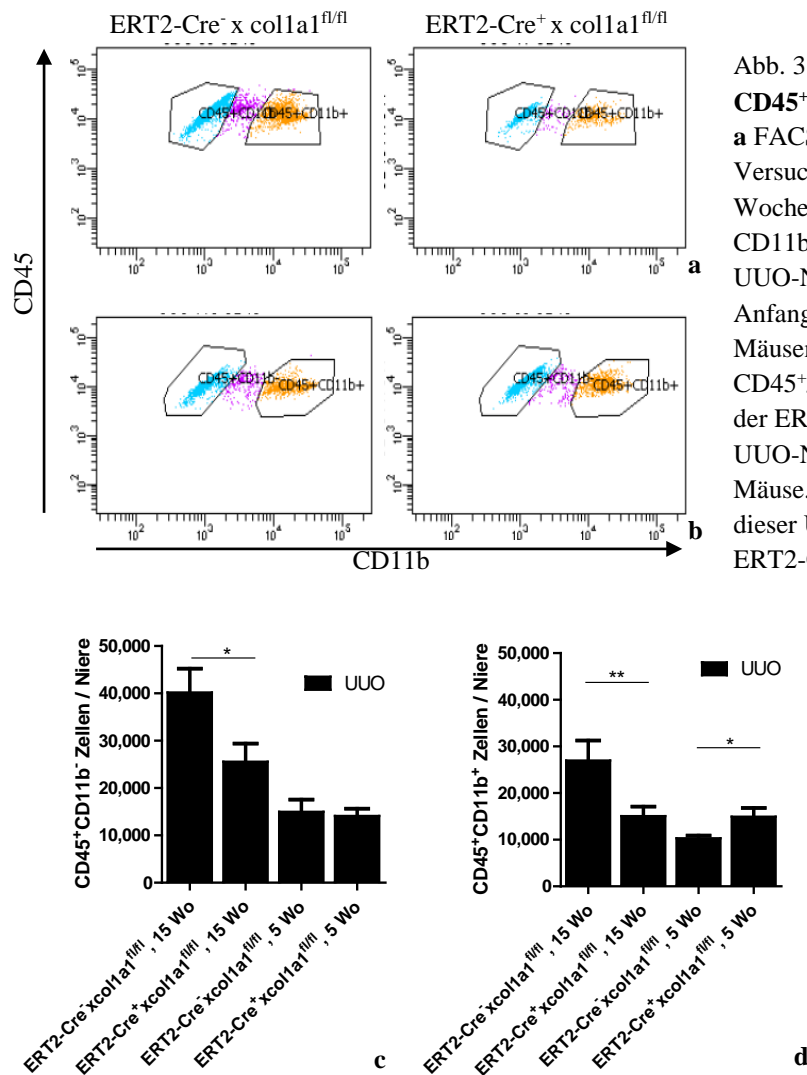


Abb. 3.18 Vierwöchige Applikation von Tamoxifen verringert die intrazelluläre Kollagenexpression in den UO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere.

a FACS-Blots zu den UO-Nieren der beiden Versuchsgruppen mit Anfangsalter 15 Wochen. **b** UO-Nieren der Versuchsgruppen mit Anfangsalter 5 Wochen. **c** KO-Nieren von Mäusen mit Anfangsalter 15 Wochen (links) und 5 Wochen (rechts). **d** In beiden Altersgruppen enthielten die UO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse signifikant weniger Kollagen-positive Zellen als die Kontrollgruppe. (n = 6-13; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ± SEM)



3.2.1.5 Folgen des Kollagen-Knockouts auf histologisch und immunhistologisch nachweisbare Proteinablagerungen nach vierwöchiger Tamoxifengabe

Wiederum wurden die Auswirkungen des Kollagen-Knockouts auf die Ablagerung von Bindegewebe mithilfe histologischer und immunhistochemischer Methoden beurteilt. In der Masson-Trichrom-Färbung sank die prozentuale Fläche, die die bläulich angefärbten fibrotischen Fasern sieben Tage nach der UUO im Nierengewebe darstellten, bei den Tieren mit dem induzierten Kollagen-Knockout hochsignifikant ab. Bereits in der älteren Gruppe mit einem Einstiegsalter von fünfzehn Wochen reduzierte sich die fibrotische Fläche bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tieren auf etwa ein Drittel des Wertes der gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse. Bei den jüngeren Tieren, die zu Beginn fünf Wochen alt waren, sank der prozentuale Flächenwert der fibrotischen Fasern in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere sogar fast bis auf das Niveau der KO-Nieren ab (s. Abb. 3.20). Es ist davon

auszugehen, dass der Wert der KO-Nieren mit dem Knockout nicht ganz erreicht werden kann, weil die Masson-Trichrom-Färbung viele verschiedene Fasern der EZM und nicht nur Kollagen Typ I anfärbt.

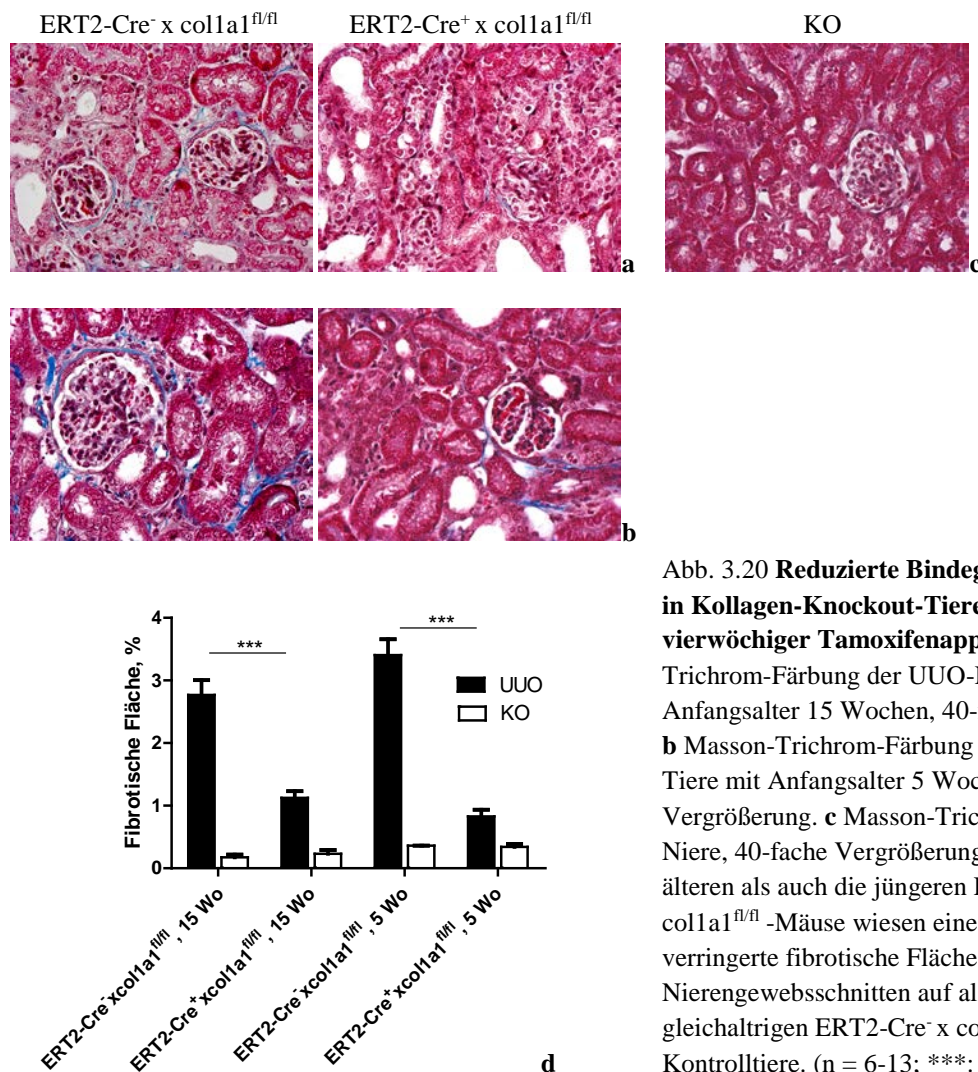


Abb. 3.20 **Reduzierte Bindegewebeinlagerung in Kollagen-Knockout-Tieren nach vierwöchiger Tamoxifenapplikation.** **a** Masson-Trichrom-Färbung der UVO-Nieren der Tiere mit Anfangsalter 15 Wochen, 40-fache Vergrößerung. **b** Masson-Trichrom-Färbung der UVO-Nieren der Tiere mit Anfangsalter 5 Wochen, 40-fache Vergrößerung. **c** Masson-Trichrom-Färbung KO-Niere, 40-fache Vergrößerung. **d** Sowohl die älteren als auch die jüngeren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse wiesen eine hochsignifikant verringerte fibrotische Fläche in den UVO-Nierengewebschnitten auf als ihre jeweils gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Kontrolltiere. (n = 6-13; ***: p < 0,001; ± SEM)

Die Kollagen Typ I-Immunhistologie bestätigte die Beobachtungen in der Masson-Trichrom-Färbung. Auf den ersten Blick waren unter dem Mikroskop die Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen in den gefärbten Nierengewebschnitten zu erkennen. In den UVO-Nieren der Kollagen-Knockout-Mäusen stellte sich das rote Signal des an Kollagen gebundenen Farbstoffes deutlich blasser dar als bei den nicht Kollagen-defizienten ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäusen. Die wenigen Kollagenfasern der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse waren sehr kurz und in ihren Umrisen weniger definiert als bei den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäusen (vgl. Abb. 3.21).

Nach der quantitativen Auswertung mit MetaMorph zeigte sich, dass die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse der älteren Versuchsgruppe nach der UVO nur noch etwa ein Viertel

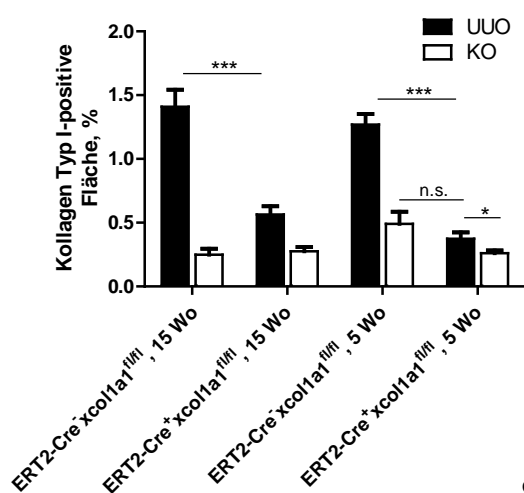
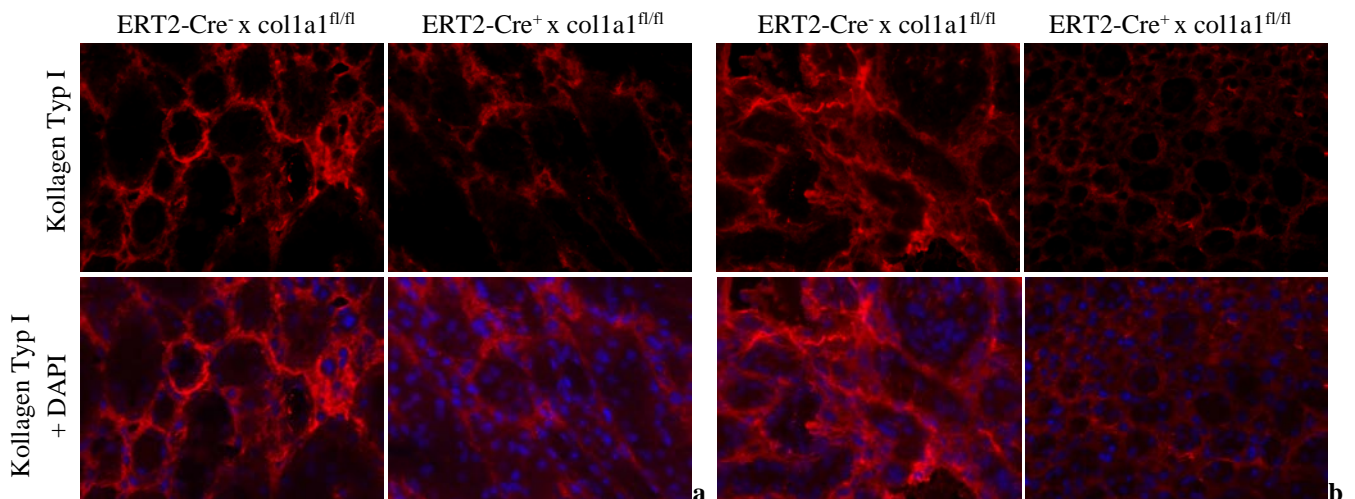
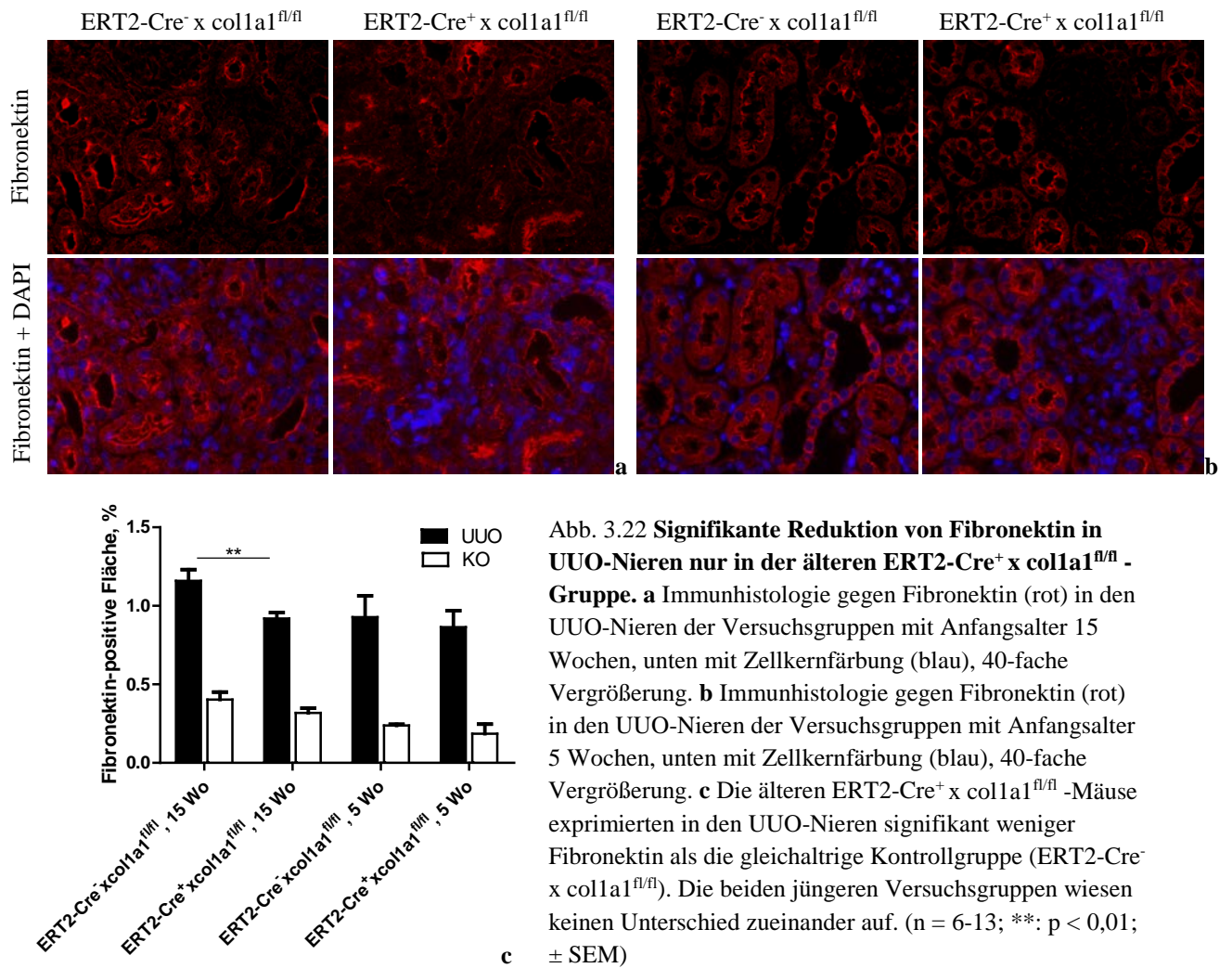


Abb. 3.21 **Reduzierte Expression von Kollagen Typ I in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse nach vierwöchiger Tamoxifengabe.** **a** Immunhistologie gegen Kollagen Typ I (rot) in den UUO-Nieren der Versuchsgruppen mit Anfangsalter 15 Wochen, unten mit Zellkernfärbung (blau), 40-fache Vergrößerung. **b** Immunhistologie gegen Kollagen Typ I (rot) in den UUO-Nieren der Versuchsgruppen mit Anfangsalter 5 Wochen, unten mit Zellkernfärbung (blau), 40-fache Vergrößerung. **c** Sowohl die älteren als auch die jüngeren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse lagerten hochsignifikant weniger Kollagen in die UUO-Nieren ein als ihre jeweiligen Kontrollgruppen (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}). In den UUO-Nieren der zu Beginn 5 Wochen alten ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-

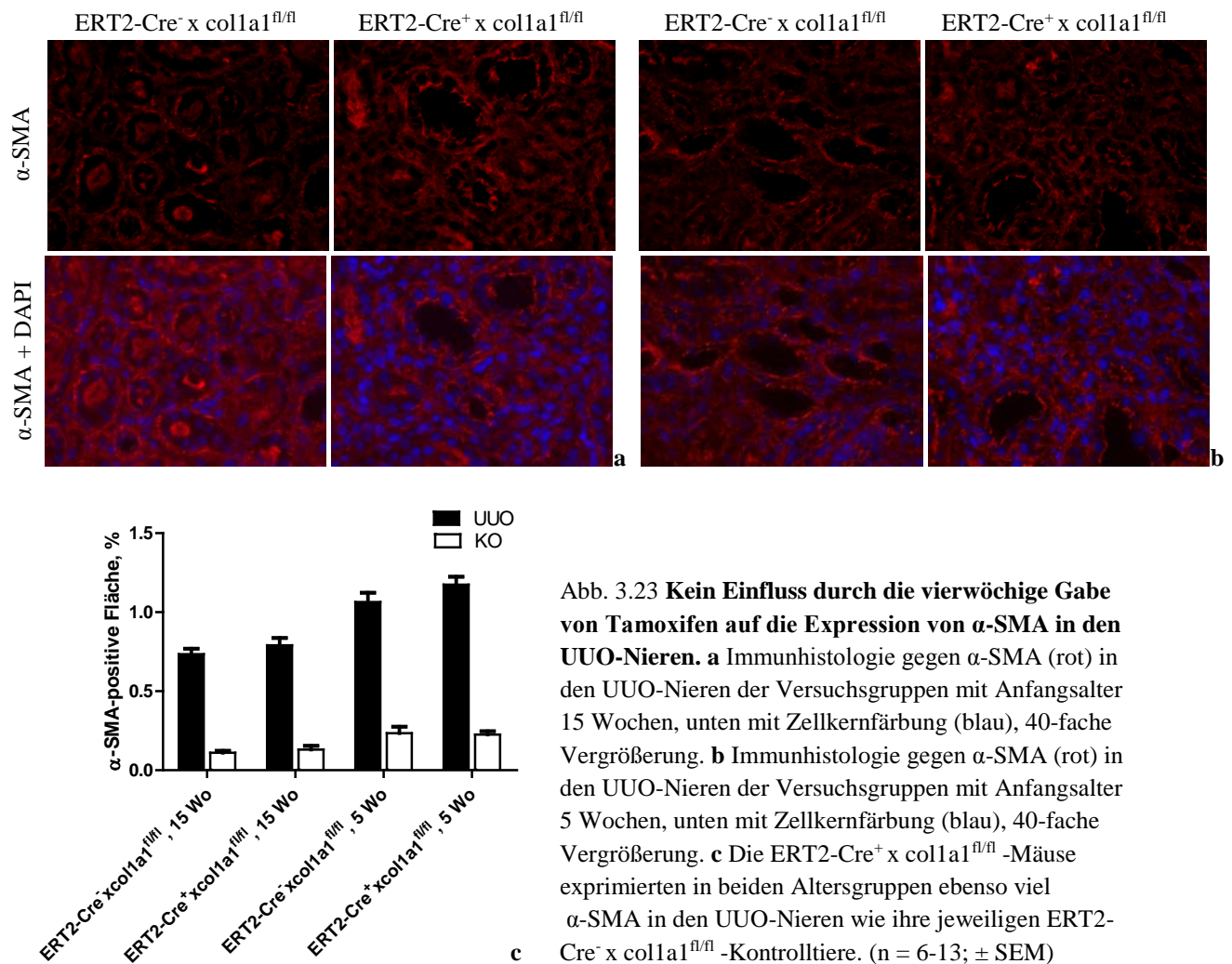
Mäuse befand sich zwar signifikant mehr Kollagen als in den KO-Nieren derselben Mäuse, doch der Unterschied zu den KO-Nieren der gleichaltrigen Kontrollgruppe war nicht signifikant. (n = 6-13; *: p < 0,05; ***: p < 0,001; n. s. = nicht signifikant; ± SEM)

des Kollagens exprimierten, das die Kontrolltiere unter gegebenen Umständen in ihre UUO-Niere einlagerten. Bei den jüngeren Tieren funktionierte der Knockout noch effektiver. Kollagen war in den UUO-Nieren dieser ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere nur noch in einer Menge vorhanden, die mit dem vergleichbar ist, was bereits in den KO-Nieren vorhanden war (s. Abb. 3.21c).

Die älteren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse exprimierten darüber hinaus in den UUO-Nieren signifikant weniger immunhistologisch nachgewiesenes Fibronectin als ihre ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Kontrolltiere. Bei den jüngeren Tieren konnte dieser Unterschied allerdings nicht mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 3.22).



Bezüglich des in den Nierengewebsschnitten ebenfalls per Immunhistologie nachgewiesenen α -SMA waren in keiner der Altersgruppen quantitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellbar (s. Abb. 3.23). Die Zahl der Myofibroblasten, auf die die Menge an α -SMA in den UUO-Nieren hinweisend ist, schien nicht genotyp-spezifisch zu sein.



3.2.1.6 Nierenmorphologische Veränderungen nach UUO mit und ohne induzierten Kollagen-Knockout

Neben der quantitativen Erfassung verschiedener Fasern oder Markerproteine mithilfe der Histologie und Immunhistologie wurde, wie unter 2.7.2 ausführlich beschrieben, untersucht, ob die durch den Knockout verminderte Fibrosierung der Nieren mit morphologischen Veränderungen in Zusammenhang stehen könnte. Die Nierengewebschnitte wurden nach H.E. gefärbt und dem beschriebenen Scoring-System entsprechend mit einer Vergabe von 0 bis 3 Punkten bewertet.

Der Vergleich zwischen UUO- und KO-Nieren nach diesem System zeigte zunächst, dass die Glomeruli der KO-Nieren im Durchschnitt deutlich weitere Kapillarlumina besaßen, während in den UUO-Nieren die Kapillarlumina meist verengt oder vollkommen kollabiert und die EZM des Glomerulums oft leicht vermehrt waren. Dies führte im Mittel zu deutlich höheren Scoring-Werten für UUO-Nieren in der Kategorie „Kapillarschlingen“ (s. Abb. 3.24d).

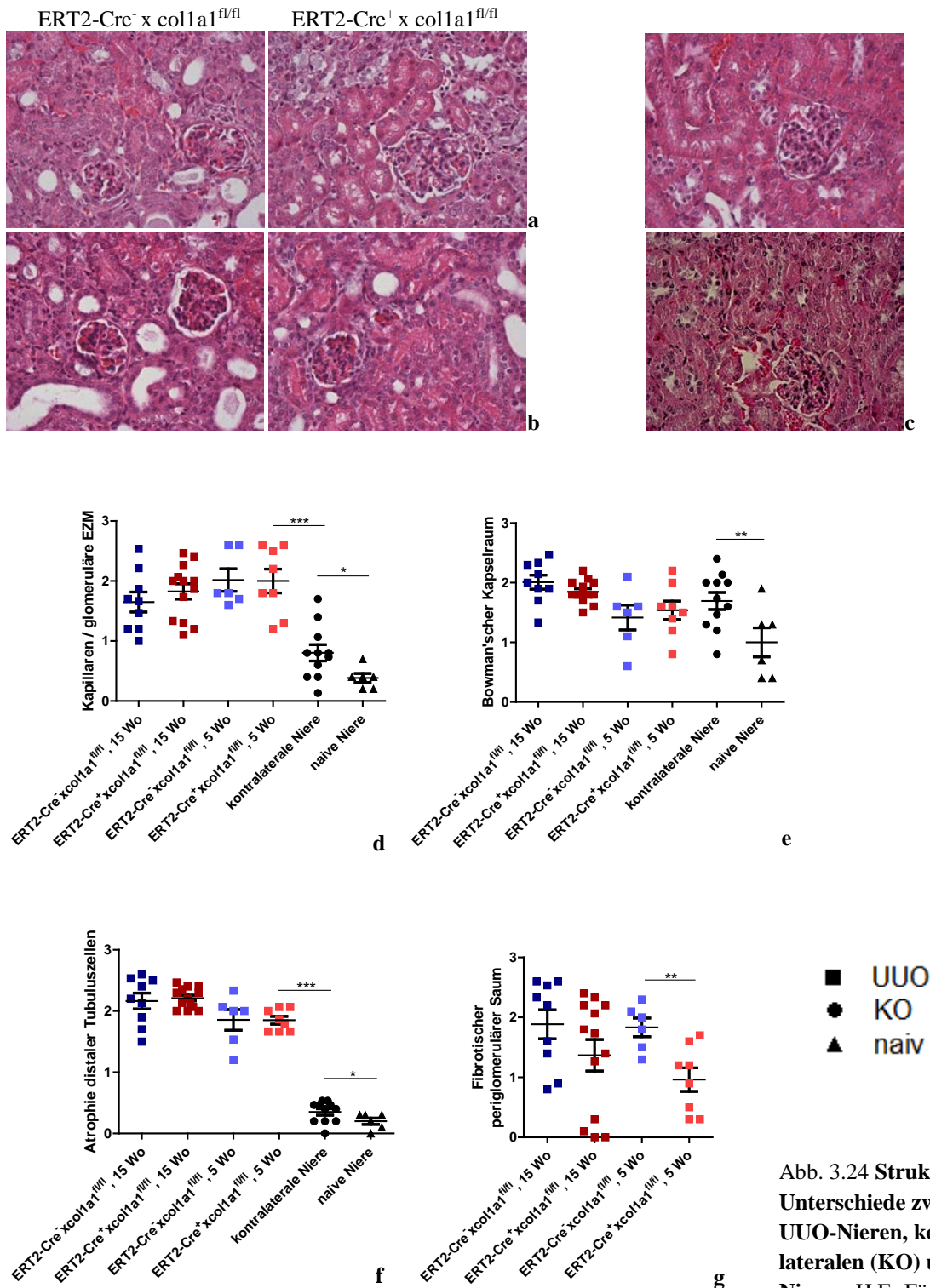


Abb. 3.24 **Strukturelle Unterschiede zwischen UUO-Nieren, kontralateralen (KO) und naiven Nieren.** H.E.-Färbung und

Bewertung mit dem Scoring-System. **a** UUO-Nieren der Mäuse mit Anfangsalter 15 Wochen, 40-fache Vergrößerung. **b** UUO-Nieren der Mäuse mit Anfangsalter 5 Wochen, 40-fache Vergrößerung. **c** KO-Niere (oben) und naive Niere (unten), 40-fache Vergrößerung. **d** Die KO- und naiven Nieren wiesen signifikant weitere Kapillarlumina in den Glomeruli auf als die UUO-Nieren (Signifikanz aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einmal beispielhaft eingezeichnet). **e** Die naiven Nieren zeigten weitere Bowman'sche Kapselräume als die KO- und die UUO-Nieren. Zwischen letzteren bestand kein Unterschied. **f** Die KO-Nieren verfügten über signifikant dickere distale Tubuluszellen als die UUO-Nieren. **g** In der Gruppe der älteren Versuchstiere bildeten die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse tendenziell dünnere fibrotische Säume um die Glomeruli der UUO-Nieren aus. Bei den jüngeren Tieren hatten die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse hochsignifikant dünnere fibrotische Säume rund um die Glomeruli. (n = 6-13; *: p < 0,5; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

Die Weite des Bowman'schen Kapselraumes war in verschiedenen Gewebeschnitten und auch innerhalb eines Schnittes sehr variabel und nicht systematisch den jeweiligen Gewebezuständen (UUO, KO, naiv) zuzuordnen. Die Scoring-Werte der UUO- und der KO-Nieren glichen sich nahezu, nur die naiven Nieren hatten signifikant weitere Bowman'sche Kapselräume (s. Abb. 3.24e).

Der Fibrosesaum, der sich nach der UUO rund um die glomeruläre Kapsel bildete, war bei den KO-Nieren, die sich noch in einem annähernd physiologischen und nicht fibrotischen Zustand befanden, ebenso wie in den naiven Nieren nicht auswertbar.

Sehr eindrücklich war dagegen das Ausmaß, in dem die Zellen der distalen Tubuli nach der UUO atrophierten und an Durchmesser einbüßten. Während in den KO-Nieren Durchmesser von üblicherweise 13 bis 15µm gemessen wurden, lag der Zelldurchmesser in UUO-Nieren meist nur noch zwischen 7 und 10µm. Dies äußerte sich in Scoring-Werten von knapp über 0 für KO- und naive Nieren und einem durchschnittlichen Wert von über 2 für UUO-Nieren (s. Abb. 3.24f).

Wenn man die UUO-Nieren der beiden verschiedenen Genotypen miteinander verglich, zeigten sich weder für die Kapillarlumina noch den Bowman'schen Kapselraum Unterschiede in den Scoring-Werten. Auch die Zellen der distalen Tubuli der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse und der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse waren im Mittel bei beiden Altersgruppen etwa gleich dick. Der fibrotische Saum um die Bowman'sche Kapsel war bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tieren jedoch signifikant dünner als bei den Kontrolltieren, und das in beiden Altersgruppen (s. Abb. 3.24g).

3.2.2 Tamoxifenapplikation über Medizinalfutter im 5+2-Wochenschema

3.2.2.1 Versuchsanordnung

Nach dem bereits sehr erfolgreichen Versuch, den Kollagen-Knockout in den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäusen mit der vierwöchigen Gabe des Tamoxifen-haltigen Medizinalfutters zu erreichen, stellte sich die Frage, ob dieses Ergebnis mit einer längeren Gabe des Futters weiter optimiert werden konnte. Zudem wurde der Versuch mit der Einbeziehung einer Kontrollgruppe des Genotyps ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} komplettiert.

Der neue Versuchsaufbau beinhaltete eine fünf Wochen dauernde Gabe des Medizinalfutters mit Tamoxifen (Konzentration 400mg/kg) *ad libitum* ohne anderweitige Zufütterung. Vor und nach der Applikation des Tamoxifen wurde den Tieren die im Tierlabor übliche Standarddiät verabreicht. Nach dem Absetzen des Medizinalfutters wurde zwei Wochen lang bis zur UUO

gewartet, damit den Tiere nach dem längeren Applikationszeitraum auch mehr Zeit zur Verfügung stand, sich wieder an die Standarddiät zu gewöhnen. Eine Woche nach der UUO erfolgte die Beendigung des Versuchs (s. Abb. 3.25). Zur Auswertung der Versuchsergebnisse wurden beide Nieren entnommen. Schwanzbiopsien wurden an Tag 0, unmittelbar vor dem Ansetzen des Medizinalfutters, am Tag der UUO (Tag 49) und am Tag des Versuchsendes (Tag 56) abgenommen.

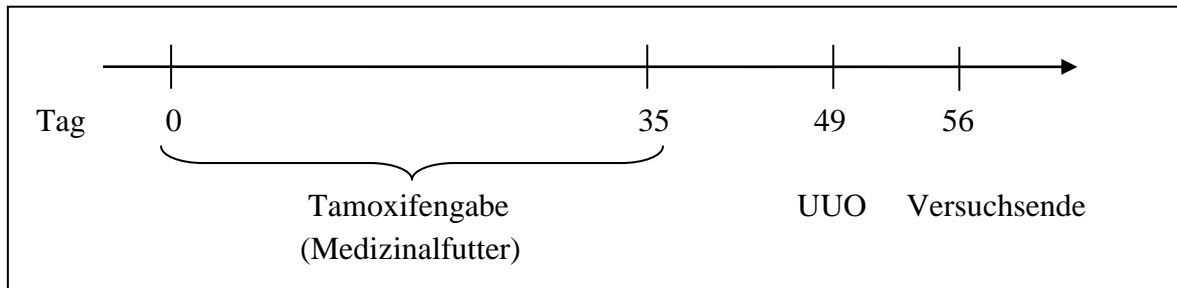


Abb. 3.25 **Versuchsaufbau für das 5+2-Schema zur Applikation von Tamoxifen über Medizinalfutter.** Die Mäuse bekamen fünf Wochen lang das Medizinalfutter mit Tamoxifen verabreicht, um den Knockout in den ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren zu induzieren (Tag 0 bis 35). Danach wurde auf normales Futter umgestellt. An Tag 49 erfolgte die Durchführung der UUO. Eine Woche später, an Tag 56, wurde der Versuch beendet und die beiden Nieren entnommen. Schwanzbiopsien wurden an Tag 0, 49 und 56 abgenommen.

Für den Versuch wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet. Sie hatten den Genotyp ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}, ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl} oder ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt} und waren zu Beginn des Versuchs etwa fünf Wochen alt. Die drei Versuchsgruppen gestalteten sich demnach folgendermaßen:

- ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, n = 7 (4 Männchen, 3 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, n = 8 (5 Männchen, 3 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, n = 7 (7 Männchen)

Die erste und die dritte der aufgeführten Gruppen wurden als Kontrollgruppen aufgefasst.

Die Genotypen wurden mittels PCR aus Schwanzbiopsien verifiziert (s. Abb. 3.26).

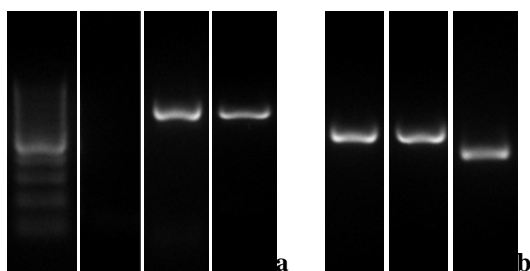


Abb. 3. 26 **Genotypen der Versuchsgruppen.**

a Genotypisierung für ERT2-Cre aus Schwanzbiopsien. Die Bande für ERT2-Cre blieb bei den ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere negativ (2. von links) und zeigte sich bei den weiteren Versuchsgruppen positiv (ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}; 3. von links, ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt}; rechts). Ganz links ein DNA-Ladder mit stärkster Bande bei 500bp.**b** Genotypisierung für Flox aus

Schwanzbiopsien. Bei den ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren (links) und den ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren (Mitte) erschien die 569bp-Bande, die das Vorhandensein der Flox-Sequenzen anzeigte. Bei der Gruppe mit dem Kollagen-Wildtyp-Gen (ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt}, rechts) erschien eine kürzere Bande (s. Kap. 2.2.3).

3.2.2.2 Rekombination des Kollagen-Gens nach fünfwöchiger peroraler Applikation von Tamoxifen

Wie bereits zur Auswertung der vorangegangenen Versuchsanordnungen, erfolgte auch nach der fünfwöchigen Applikation von Tamoxifen die Analyse der DNA aus Schwanzbiopsien und Nierengewebe.

Wie erwartet, war die 746bp-Bande in der Kollagen-PCR positiv für die DNA aus den Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere sowie aus deren Schwanzbiopsien zum Zeitpunkt nach der Gabe von Tamoxifen (Tag 56). Mit der DNA der Schwanzbiopsien von Tag 0 sowie der DNA der beiden Kontrollgruppen (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} und ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}) aus Schwanz und Nieren verlief die PCR negativ für die 746bp-Bande (s. Abb. 3.27).

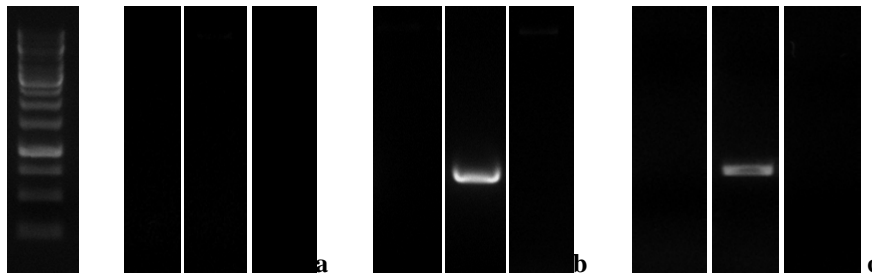


Abb. 3.27 **Fünfwöchige Applikation von Tamoxifen bewirkt die Rekombination des Kollagen-Gens in den ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tieren.** Aufgetragen sind ganz links ein DNA-Ladder (kräftigste Bande bei 1000bp) sowie jeweils von links nach rechts das Kollagen-PCR-Produkt der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -, ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} - bzw. ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Versuchsgruppe. **a** In den Schwanzbiopsien von Tag 0 war die 746bp-Bande bei allen drei Versuchsgruppen negativ. **b** Ausgehend von der DNA der Schwanzbiopsien von Tag 56 erschien die 746bp-Bande in der Gruppe der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse (Mitte). **c** Positive 746bp-Bande im PCR-Produkt ausgehend von DNA aus den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse (Mitte), Bande negativ für die beiden anderen Gruppen.

Mit DNA aus den Schwanzbiopsien der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere und der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere wurde darüber hinaus die PCR für Flox durchgeführt und wie unter 2.2.3 beschrieben quantitativ ausgewertet. An Tag 49 und Tag 56, nach der Applikation von Tamoxifen, enthielten die zellulären Genome der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere offenbar nur noch sehr selten intakte Kollagen Typ I-Gene. Dies spiegelte sich in der Tatsache wider, dass ihre Banden für Flox im Vergleich zu den Banden der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere oder der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere an Tag 0 sehr blass erschienen und nur noch einen geringen DNA-Gehalt aufwiesen (s. Abb. 3.28).

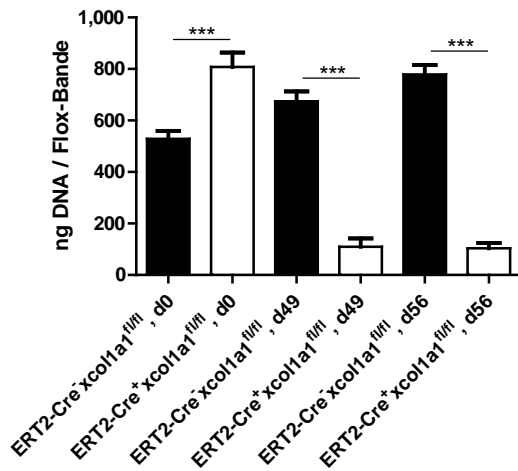
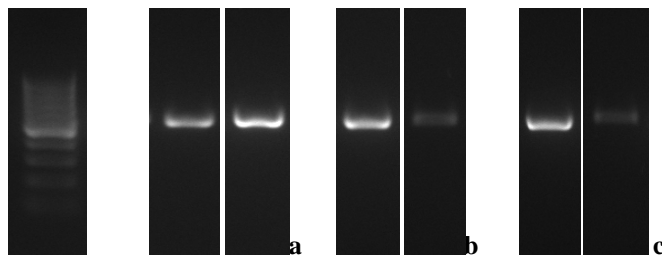


Abb. 3.28 **Hohe Effektivität der Rekombination des Kollagen Typ I-Gens nach fünfwöchiger Tamoxifenapplikation.** Links oben DNA-Ladder mit kräftigster Bande bei 500bp. **a** PCR für Flox aus Schwanzbiopsien von Tag 0, links ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, rechts ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}. **b** Tag 49. **c** Tag 56. **d** In den Flox-Banden für die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse an Tag 49 und Tag 56, d. h. nach der Gabe von Tamoxifen, konnte über die Intensitätsmessung unter UV-Licht nur noch sehr wenig DNA detektiert werden. (n = 6-7; ***: p < 0,001; ± SEM)

3.2.2.3 Folgen der Rekombination für die mRNA nach fünfwöchiger Tamoxifengabe

Auf die Expression der *Kollagen Typ I*-mRNA hatte der induzierte Kollagen-Knockout durch fünfwöchige Tamoxifengabe deutliche Auswirkungen. In den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse fanden sich hochsignifikant weniger Transkripte des Kollagen Typ I-Gens wieder als in den UUO-Nieren der beiden Kontrollgruppen (s. Abb. 3.29a).

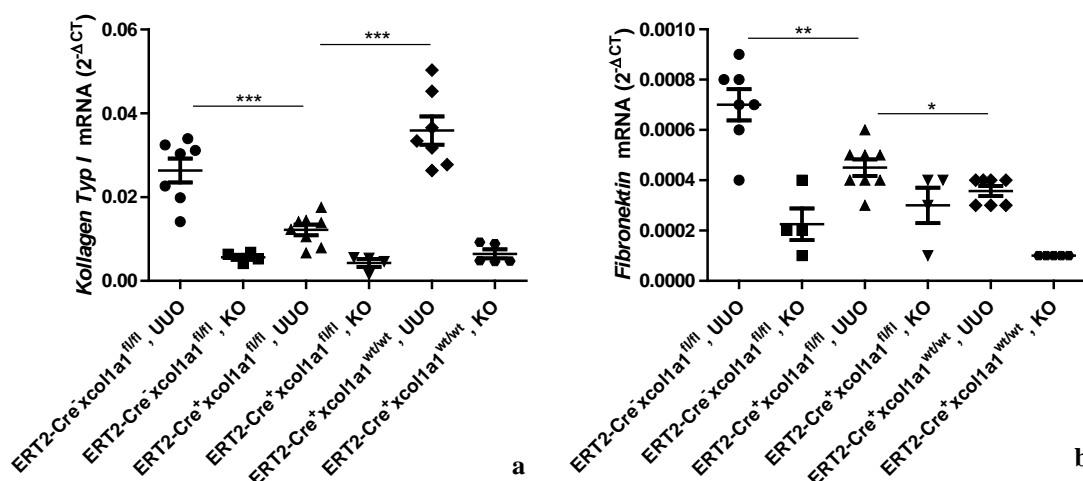


Abb. 3.29 **Geringe Transkription des Kollagen Typ I-Gens in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse nach fünfwöchiger Tamoxifengabe.** **a** Die Knockout-Tiere exprimierten in den UUO-Nieren hochsignifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA als die ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse oder die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse. **b** Die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere exprimierten in den UUO-Nieren weniger *Fibronectin*-mRNA als die ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tiere, aber signifikant mehr als die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Tiere. (n = 6-7; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

Auch die mRNA für Fibronektin war in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse signifikant ausgeprägter vorhanden als in den Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse. In den Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse wurde allerdings noch weniger *Fibronektin*-mRNA exprimiert (s. Abb. 3.29b).

3.2.2.4 Auswirkungen des Kollagen-Knockouts auf die intrazelluläre Expression von Kollagen und die Leukozyteninfiltration in den UUO-Nieren nach fünfwöchiger Tamoxifengabe

Bei der Analyse des intrazellulären Kollagens im FACS zeigte sich die hohe Effektivität des Kollagen-Knockouts vor allem im Vergleich mit der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Kontrollgruppe. Wie in Abb. 3.30 zu sehen ist, enthielten die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse auch signifikant weniger Kollagen-positive Partikel als die UUO-Nieren der

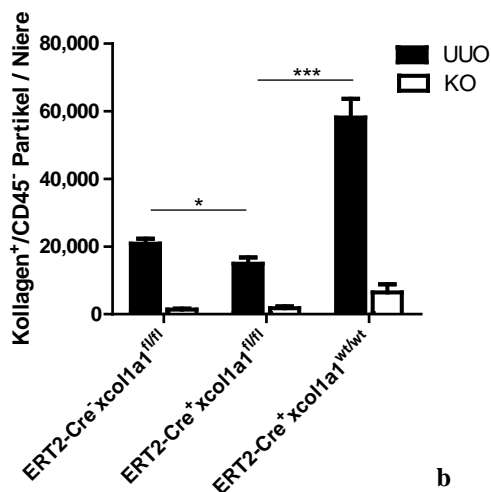
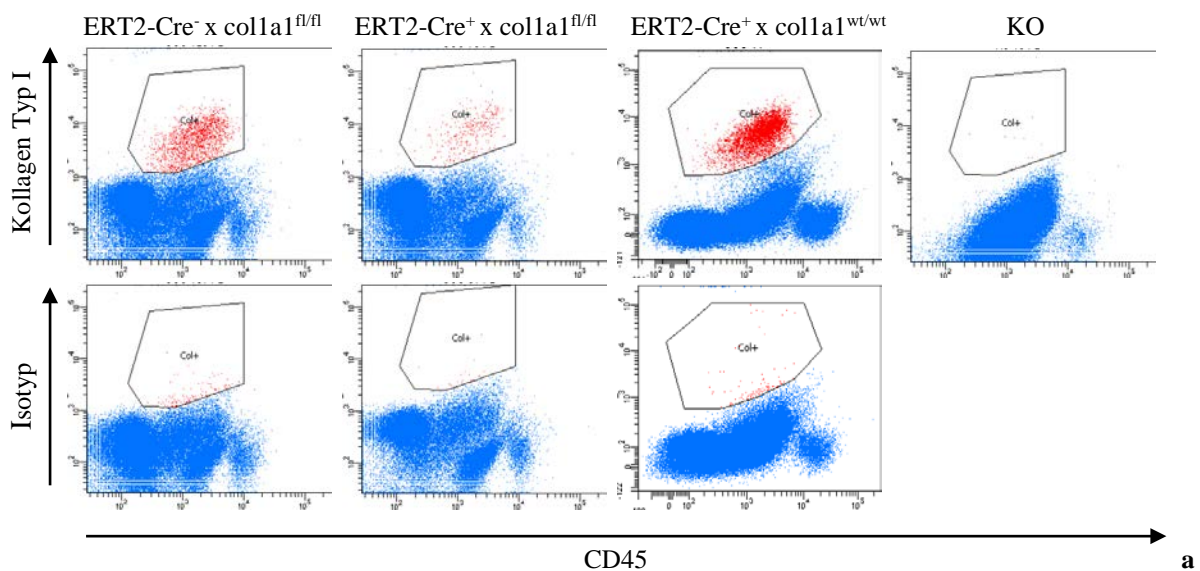


Abb. 3.30 Die fünfwöchige Tamoxifenapplikation lässt die intrazelluläre Kollagen-Expression der Knockout-Tiere absinken. **a** Beispielbilder der FACS-Blots der Nierenproben nach UUO, Färbung gegen CD45 und Kollagen bzw. Isotyp. Der Isotyp ist weitgehend negativ. Die KO-Nieren enthalten kaum Kollagen-positive Events. **b** Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse enthalten weniger Kollagen-positive Partikel als die der Kontrollgruppen. Allerdings befinden sich wesentlich mehr Kollagen-positive Partikel in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse als in denen der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse. (n = 6-7; *: p < 0,05; ***: p < 0,001; ± SEM)

ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Tiere. Ins Auge sticht jedoch die sehr hohe Zahl an Kollagen-positiven Partikeln in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Tiere, die nicht nur signifikant höher war als die der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Mäuse, sondern auch die der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Mäuse.

Bezüglich der Anzahl der infiltrierenden CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen in den UUO-Nieren zeigte sich, dass das Gewebe der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Mäuse weniger CD45⁺/CD11b⁻ Zellen und mehr CD45⁺/CD11b⁺ Zellen als die beiden anderen Versuchsgruppen enthielt (s. Abb. 3.31).

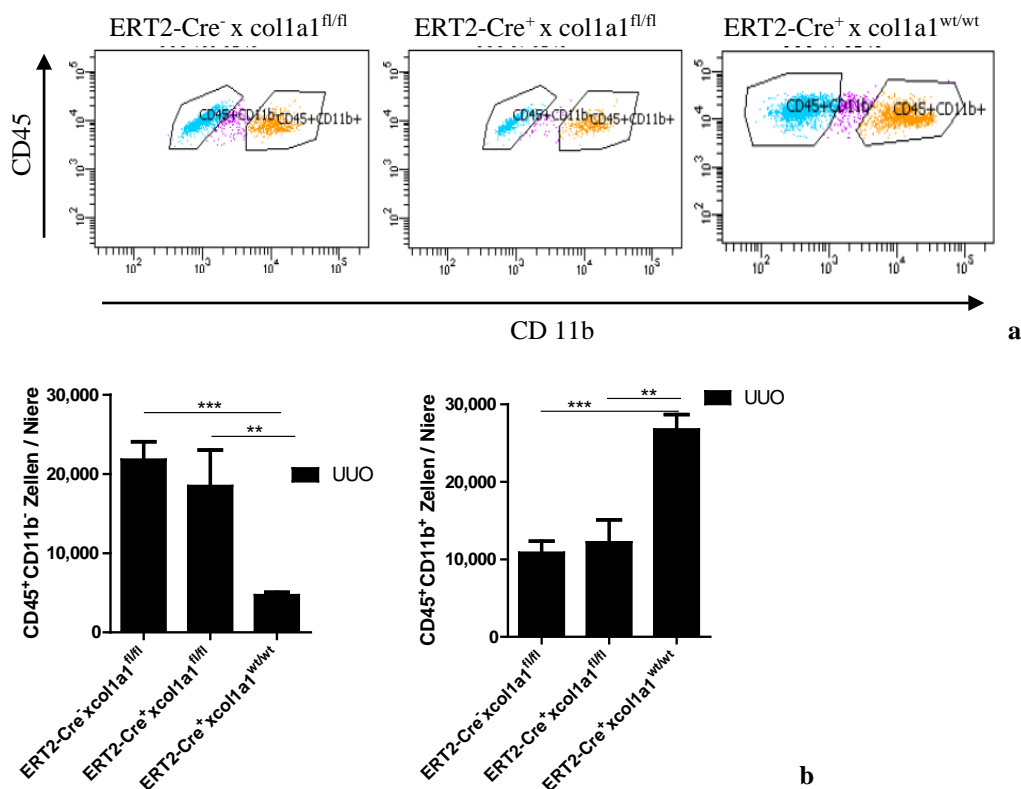
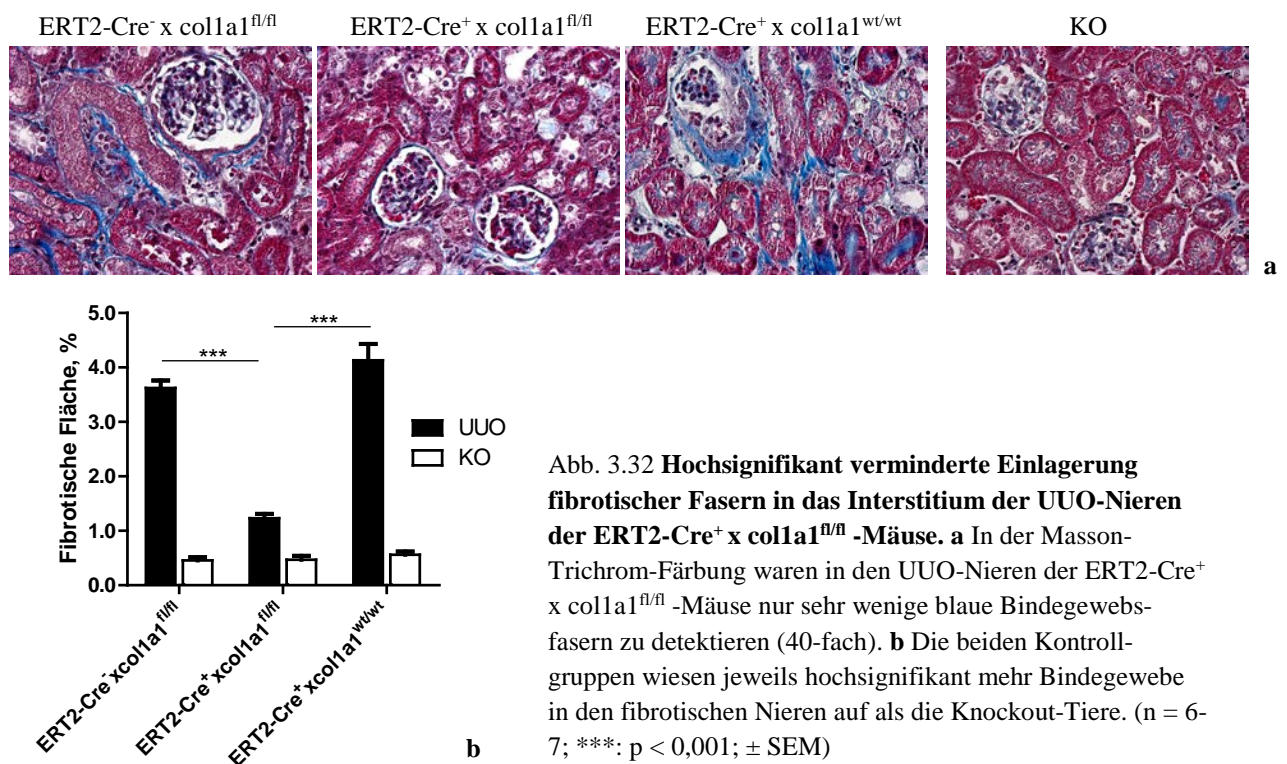


Abb. 3.31 Abweichendes Verteilungsmuster der CD11b⁻ und CD11b⁺ Zellen in UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse. **a** Beispielbilder der FACS-Blots mit Färbung gegen CD45 und CD11b. **b** Die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} - und die ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Mäuse wiesen untereinander keine Unterschiede in der Zahl der CD45⁺CD11b⁻ Zellen und der CD45⁺CD11b⁺ Zellen in ihren UUO-Nieren auf. Die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Tiere enthielten hingegen in ihren UUO-Nieren signifikant weniger CD45⁺CD11b⁻ Zellen und signifikant mehr CD45⁺CD11b⁺ Zellen als die Mäuse der beiden anderen Genotypen. (n = 6-7; ** p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

3.2.2.5 Auswirkungen des Kollagen-Knockouts auf histologisch und immunhistologisch nachweisbare Proteinablagerungen nach fünfwöchiger Tamoxifengabe

Mithilfe der Histologie und Immunhistologie wurde ermittelt, ob sich die Ergebnisse aus dem FACS für den extrazellulären Raum bestätigen ließen.

In der Masson-Trichrom-Färbung zeigte sich, dass die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere wesentlich weniger bindegewebiges Material als Ausdruck der Fibrose enthielten als die beiden Kontrollgruppen. Der Flächenanteil der fibrotischen Fasern an der Gesamtfläche des Gewebeschnittes näherte sich eher den Werten für die KO-Nieren als denen für die UUO-Nieren der Kontrollgruppen an. Die Nierengewebeschnitte der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse wiesen etwas mehr fibrotische Fläche auf als diejenigen der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse (s. Abb. 3.32).



Um die Kollagen Typ I-Fasern unabhängig von den übrigen Bindegewebsproteinen beurteilen zu können, wurde die immunhistologische Färbung für Kollagen Typ I angeschlossen. Nach dieser Färbung waren auf den mikroskopischen Präparaten der UUO-Nieren der induzierten Knockout-Tiere kaum noch Kollagenfasern nachzuweisen. Die wenigen auffindbaren Fasern erschienen so blass, dass sie sich nur schwach von der Hintergrundfluoreszenz abhoben. Sie waren zudem viel kürzer als die dicht verwobenen Fasern in den UUO-Nieren der Kontrolltiere. Der Anteil der Kollagen Typ I-positiven Fläche an der Gesamtfläche hatte sich in den

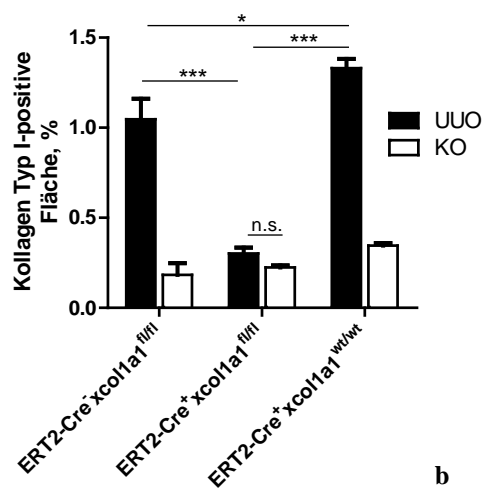
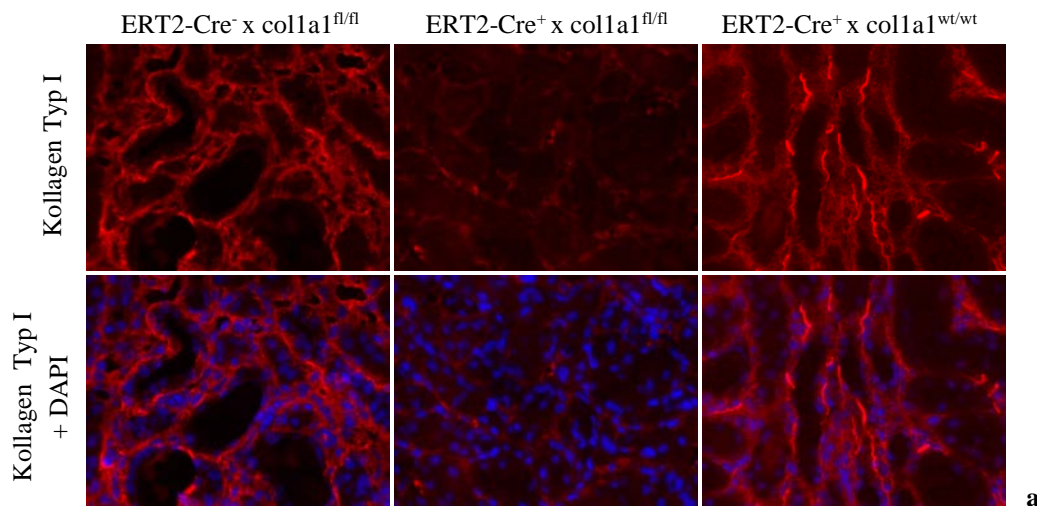


Abb. 3.33 **Deutlich reduzierte Einlagerung von Kollagen Typ I nach 5-wöchiger Tamoxifenapplikation bei ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tieren.** **a** Immunhistologie gegen Kollagen Typ I (rot) in den UO-Nieren, in der unteren Reihe mit Zellkernfärbung (blau), 40-fache Vergrößerung. Die UO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Tiere enthielten nur noch Spuren von Kollagen Typ I. **b** Quantitative Auswertung der Kollagen Typ I-positiven Fläche mit deutlicher Reduktion der Ablagerung von Kollagen in den UO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren. (n = 6-7; *: p < 0,05; ***: p < 0,001; n.s. = nicht signifikant; ± SEM)

Knockout-Tieren dem niedrigen Basisniveau der KO-Nieren angeglichen. Die ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt}-Mäuse exprimierten in den fibrotischen Nieren etwas mehr Kollagen als die ERT2-Cre⁻ x coll1a1^{fl/fl}-Mäuse (s. Abb. 3.33).

Die immunhistologische Färbung von Fibronectin zeigte, dass Fibronectin in den UO-Nieren aller drei Versuchsgruppen gleichermaßen exprimiert wurde. Die leichten Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (s. Abb. 3.34).

Auch die für α -SMA positive Fläche war auf den Nierengewebschnitten aller drei Versuchsgruppen etwa gleich stark ausgeprägt (s. Abb. 3.35).

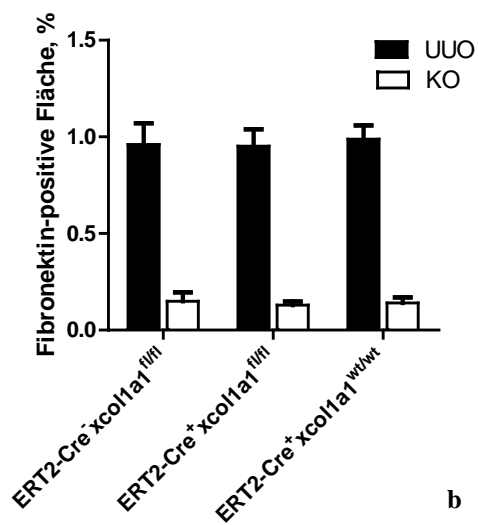
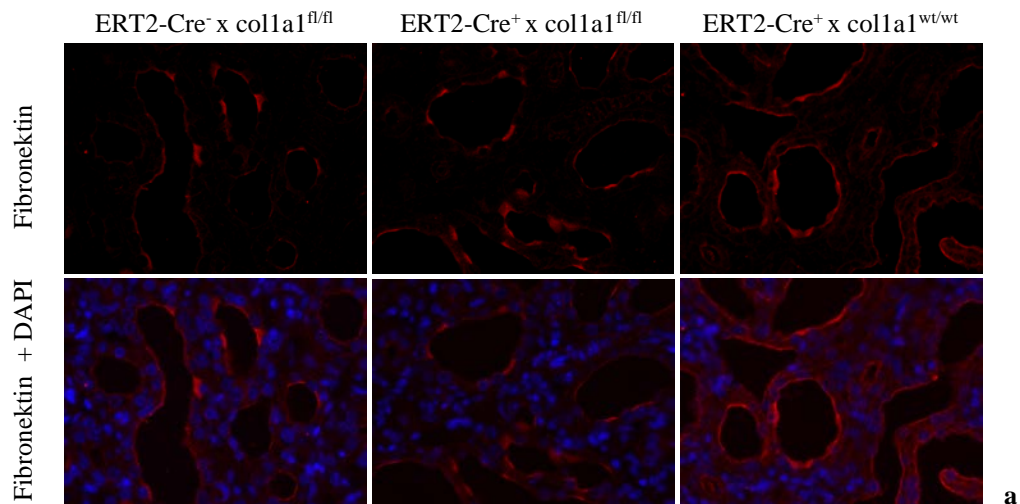


Abb. 3.34 Ablagerung von Fibronectin in den UUO-Nieren der Versuchstiere nach fünfwöchiger Tamoxifengabe. **a** Immunhistologie gegen Fibronectin (rot) in den UUO-Nieren, untere Reihe mit Zellkernfärbung (blau), 40-fache Vergrößerung. **b** Der Anteil an Fibronectin-positiver Fläche auf den Nierengewebschnitten unterschied sich nicht zwischen den drei Versuchsgruppen. (n = 6-7; ± SEM)

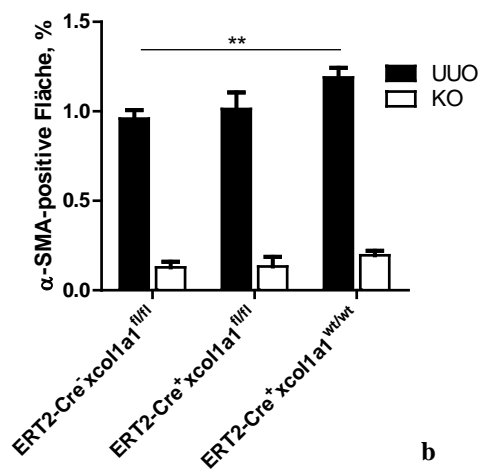
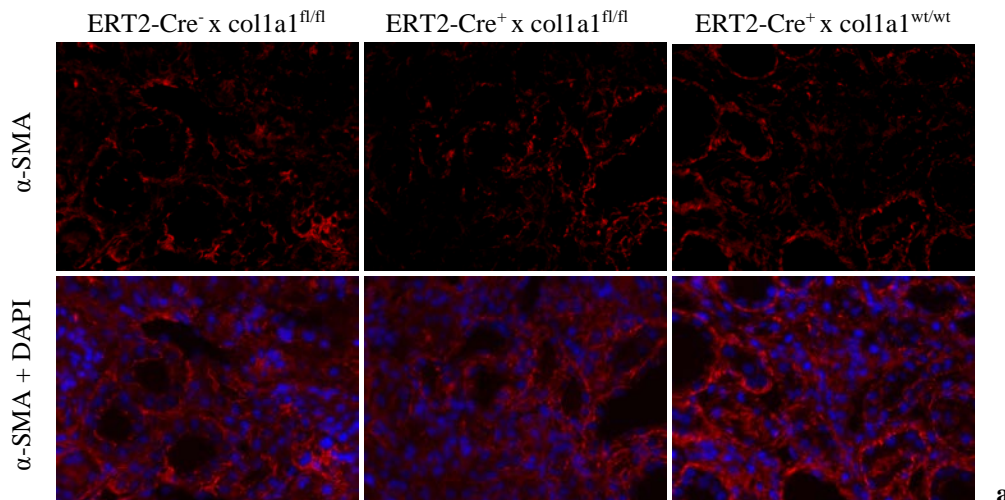


Abb. 3.35 **Einlagerung von α -SMA in die Nieren der Versuchstiere nach fünfwöchiger Tamoxifengabe und UO.** **a** Immunhistologie gegen α -SMA (rot) in den UO-Nieren, in der unteren Reihe mit Zellkernfärbung (blau), 40-fache Vergrößerung. **b** Der Anteil an α -SMA-positiver Fläche auf den Nierengewebsschnitten unterschied sich nicht wesentlich zwischen den drei Versuchsgruppen. (n = 6-7; **: p < 0,01; \pm SEM)

3.2.2.6 Nierenmorphologische Veränderungen nach dem induzierten Kollagen-Knockout mittels fünfwöchiger Applikation von Tamoxifen per os

In der H.E.-Färbung zeigte sich nach der fünfwöchigen Applikation des Medizinalfutters ein ähnliches Bild wie nach vierwöchiger Applikation. Die UO-Nieren der drei Versuchsgruppen (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} und ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}) wiesen bei den Scoring-Werten für die Kapillarschlingen, den Bowman'schen Kapselraum und die Dicke der distalen Tubuluszellen keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. Sowohl die UO- als auch die KO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse erreichten vergleichbare Scoring-Werte wie die der Mäuse der beiden anderen Genotypen. Der fibrotische Randsaum rund um die Glomeruli nahm allerdings bei den Kollagen-Knockout-Mäusen nicht dieselbe Dicke an wie bei den Kontrollgruppen. Während die UO-Nieren der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse und der ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Mäuse in dieser Kategorie im Durchschnitt Scores von knapp 2 Punkten zugeteilt bekamen, lag der

durchschnittliche Score für die ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse weit unter 1 Punkt und damit hochsignifikant niedriger (s. Abb. 3.36).

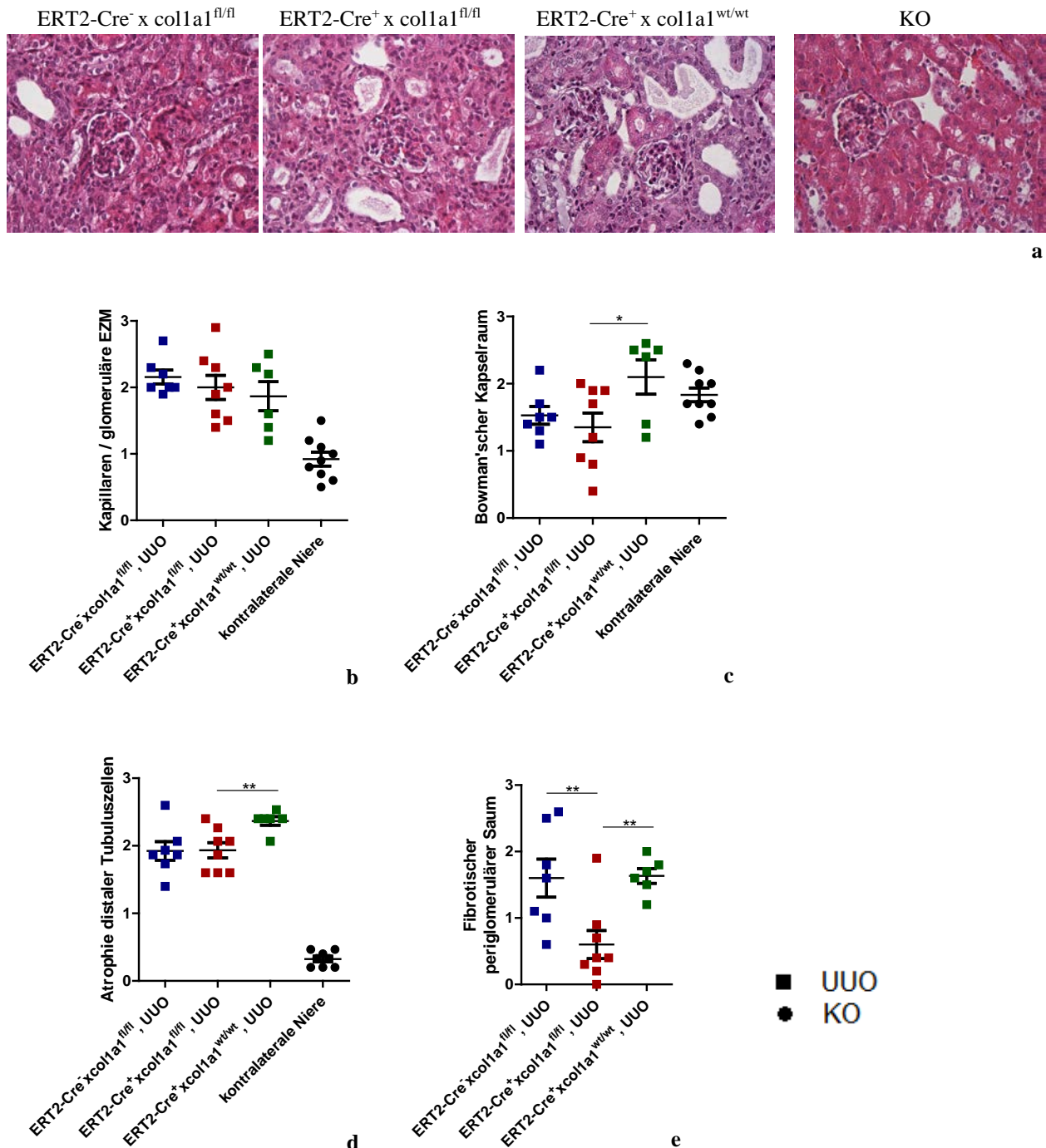


Abb. 3.36 Morphologische Veränderungen durch induzierten Kollagen-Knockout in UUO-Nieren.

a H.E.-Färbung der UUO-Nieren bzw. KO-Niere, 40-fache Vergrößerung. **b** Die UUO-Nieren der drei Versuchsgruppen wiesen bezüglich ihrer glomerulären Kapillarschlingen keine Unterschiede zueinander auf. **c** Die UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x col1a1^{wt/wt}-Tiere zeigten im Schnitt engere Bowman'sche Kapselräume als die Vergleichsgruppen. **d** Die Epithelzellen der distalen Tubuli der ERT2-Cre⁺ x col1a1^{wt/wt}-Mäuse waren nach der UUO signifikant flacher als die Tubuli der beiden anderen Versuchsgruppen. **e** Die fibrotischen Säume rund um die Glomeruli waren bei den ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäusen hochsignifikant schmäler als bei den beiden Kontrollgruppen. (n = 7-8; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ± SEM)

3.3 Einflussfaktoren auf den induzierten Kollagen-Knockout

In den vorhergehenden Kapiteln wurde detailliert auf die Ergebnisse aus den verschiedenen Versuchsanordnungen eingegangen. Zur Analyse der Effektivität des Knockouts von Kollagen Typ I sollen die zum Teil bereits dargestellten Daten nochmals unter bestimmten Gesichtspunkten zusammengefasst werden.

3.3.1 Dauer der Tamoxifengabe

Nachdem der Kollagen-Knockout mittels Tamoxifenanwendung im 4+1-Wochenschema im Sinne der Hypothese bereits zufrieden stellende Ergebnisse erzielt hatte, wurde untersucht, ob eine fünfwöchige Applikation von Tamoxifen einen noch effektiveren Knockout hervorrufen konnte. Die Daten aus diesen Versuchsanordnungen wurden bereits unter Punkt 3.2.1 und 3.2.2 präsentiert, sollen aber zur Verdeutlichung an dieser Stelle in ihren wesentlichen Punkten direkt gegenüber gestellt werden. Es handelte sich um folgende Versuchsgruppen:

- ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, Tamoxifenapplikation im 4+1-Wochenschema, n = 6 (4 Männchen, 2 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, Tamoxifenapplikation im 4+1-Wochenschema, n = 8 (5 Männchen, 3 Weibchen)
- ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, Tamoxifenapplikation im 5+2-Wochenschema, n = 7 (4 Männchen, 3 Weibchen)
- ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}, an Tag 0 etwa 5 Wochen alt, Tamoxifenapplikation im 5+2-Wochenschema, n = 8 (5 Männchen, 3 Weibchen)

Wie in Abb. 3.37 zu sehen, fanden sich zwar Anhaltspunkte, aber kein stichhaltiger Beweis dafür, dass unter den gegebenen Umständen die fünfwöchige Gabe des Medizinalfutters einen vollständigeren Knockout von Kollagen Typ I erzielte als die vierwöchige Gabe. Schon nach vier Wochen hatte der Knockout gut funktioniert.

Zwar erweckten die Ergebnisse der qPCR und der Kollagen-Immunhistologie den Eindruck, dass die fünfwöchige Tamoxifenanwendung sich optimierend auf den Knockout auswirkte, da sich die Streubreite der Messwerte für die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere verminderte. Doch die kleinen Unterschiede in der Restexpression von Kollagen in den UUO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse nach vier Wochen Tamoxifen und nach fünf Wochen Tamoxifen waren nicht signifikant. Im FACS wiesen die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Tiere nach fünf Wochen sogar mehr Kollagen-positive Partikel auf als nach vier Wochen. Zusammenfassend zeigte

sich kein wesentlicher Vorteil einer fünfwöchigen Tamoxifenapplikation gegenüber einer vierwöchigen Anwendung.

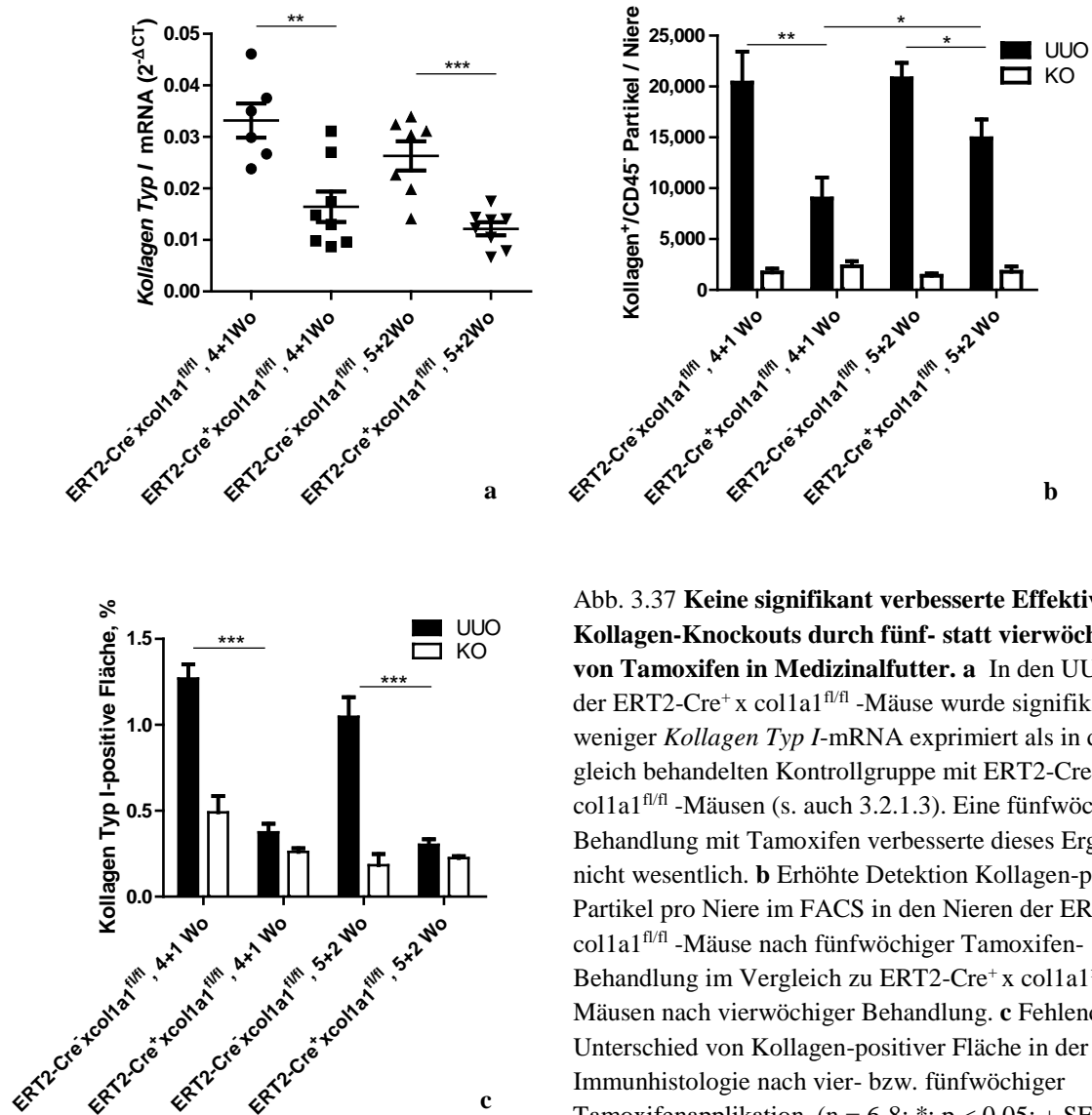


Abb. 3.37 **Keine signifikant verbesserte Effektivität des Kollagen-Knockouts durch fünf- statt vierwöchige Gabe von Tamoxifen in Medizinalfutter.** **a** In den URO-Nieren der ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse wurde signifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA exprimiert als in der jeweils gleich behandelten Kontrollgruppe mit ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäusen (s. auch 3.2.1.3). Eine fünfwöchige Behandlung mit Tamoxifen verbesserte dieses Ergebnis nicht wesentlich. **b** Erhöhte Detektion Kollagen-positiver Partikel pro Niere im FACS in den Nieren der ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäuse nach fünfwöchiger Tamoxifen-Behandlung im Vergleich zu ERT2-Cre⁺ x *coll1a1*^{fl/fl}-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung. **c** Fehlender Unterschied von Kollagen-positiver Fläche in der Immunhistologie nach vier- bzw. fünfwöchiger Tamoxifenapplikation. (n = 6-8; *, p < 0,05; ± SEM)

3.3.2 Alter der Versuchstiere

Einen weiteren möglichen Einflussfaktor auf den induzierten Knockout stellt das Alter der Versuchstiere dar. Der Einfluss des Alters auf die Wirksamkeit des Kollagen-Knockouts wurde im Wesentlichen bereits im Rahmen von Punkt 3.2.1 erörtert. An dieser Stelle soll jedoch explizit darauf hingewiesen werden, dass das Alter der Versuchstiere offenbar einen Einfluss auf die Fibrose an sich wie auch auf die Induktion des Knockout hat. Sowohl die Tiere, die zu Beginn des Versuchs 15 Wochen alt waren, als auch die jüngeren Tiere mit

einem Anfangsalter von 5 Wochen wurden zu diesem Zweck im 4+1-Versuchsschema mit Tamoxifen behandelt (s. Abb. 3.12).

Abb. 3.38 verdeutlicht den Einfluss des Alters der Tiere zu Versuchsbeginn auf die Expression von Kollagen. Bei einer Betrachtung lediglich der UUO-Nieren der Kontrolltiere (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}) fällt in der FACS-Auswertung auf, dass diese Tiere in höherem Alter mehr Kollagen in die geschädigten Nieren einlagerten als bei geringerem Anfangsalter. Darüber hinaus stellte sich die Reduktion von Kollagen durch den induzierten Knockout bei den jüngeren Tieren stärker ausgeprägt dar als bei denjenigen, die zu Beginn des Versuchs 15 Wochen alt waren. Die älteren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse wiesen nach dem Knockout noch etwas mehr als die Hälfte der Kollagen-positiven Partikel der ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäuse in den UUO-Nieren auf. Bei den jüngeren Mäusen waren es weniger als die Hälfte. Immunhistologisch betrachtet lagerten die jüngeren Knockout-Tiere signifikant weniger Kollagen in das Interstitium der UUO-Nieren ein als die älteren Knockout-Mäuse. Zusammengefasst lässt sich daraus eine höhere Effektivität des induzierten Kollagen-Knockouts für diejenigen Mäuse ableiten, die bereits ab einem Alter von 5 Wochen mit Tamoxifen behandelt wurden.

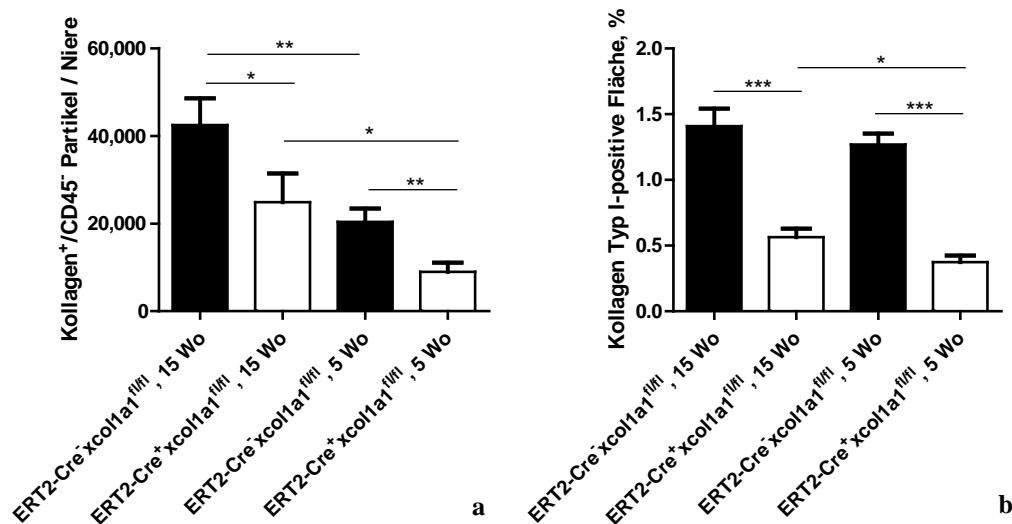


Abb. 3.38 **Effektivität des Kollagen-Knockouts im Vergleich zwischen jüngeren und älteren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäusen.** Dargestellt sind jeweils nur die Werte für die UUO-Nieren der betreffenden Versuchstiere. **a** Stärkeres Absinken der Anzahl Kollagen-positiver Partikel pro UUO-Niere bei jüngeren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäusen als bei älteren Tieren. **b** Geringere Einlagerung von Kollagen Typ I in die Nieren der jüngeren ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse. (n = 6-13; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

3.3.3 Cre/Flox-Ratio aus der Genotypisierung von Schwanzbiopsien

Als letzter Einflussfaktor auf den Kollagen Typ I- Knockout ist die Cre/Flox-Ratio zu nennen, deren Ermittlung unter 2.2.3 beschrieben wird. Die Ratio aus den Intensitäten der PCR-Banden von ERT2-Cre und Flox bei der Genotypisierung aus Schwanzbiopsien wurde im Wesentlichen gebildet, um die Zucht der Tiere besser steuern zu können. Allerdings liegt es nahe, dass diese Ratio einen Einfluss auf den konditionellen Knockout haben könnte. Je höher die Ratio ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ERT2-Cre nicht nur heterozygot, sondern homozygot im Genom vorliegt, auch wenn aufgrund der Limitationen des Messverfahrens und der hohen Schwankungsbreite der Werte nicht mit hoher Sicherheit von der Cre/Flox-Ratio auf das heterozygote oder homozygote Vorliegen von ERT2-Cre

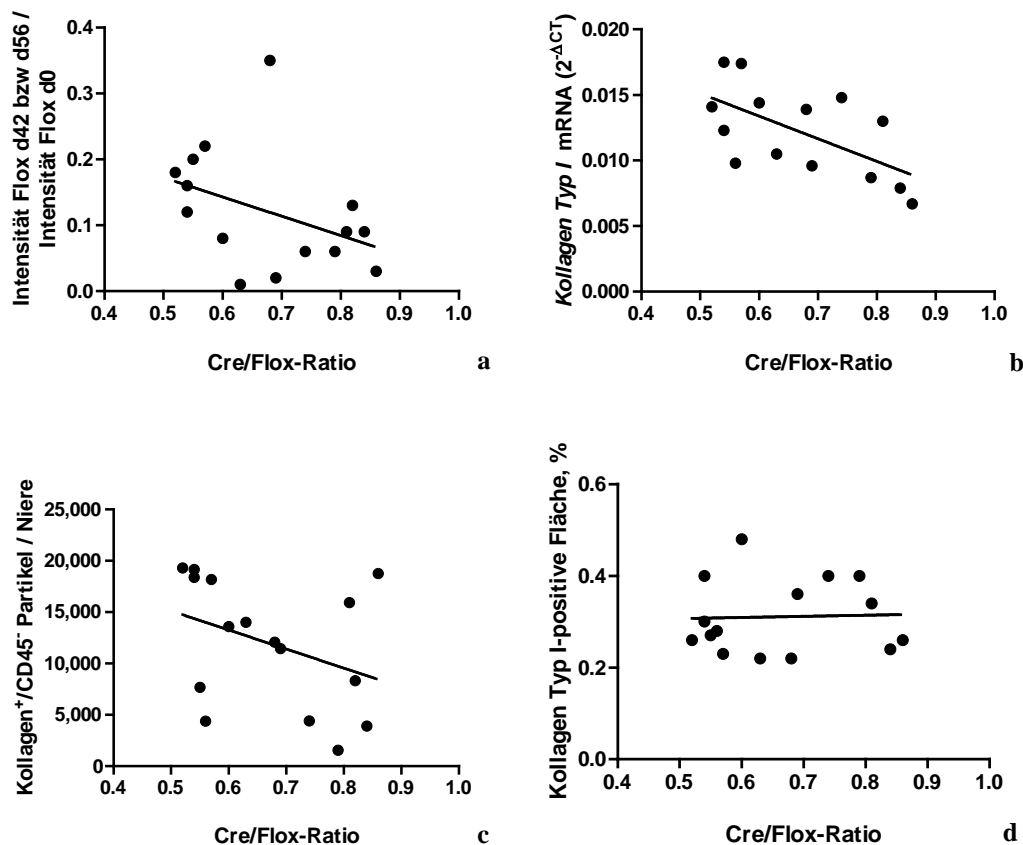


Abb. 3.39 Cre/Flox-Ratio der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäuse korreliert mit der Effektivität des induzierten Kollagen-Knockouts. Auftragung der Cre/Flox-Ratio von 4 bzw. 5 Wochen lang mit Tamoxifen behandelten ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}-Mäusen (Anfangsalter 5 Wochen) **a** gegen eine Ratio aus der Intensität der Flox-Bande an Tag 42 bzw. Tag 56 (jeweils Tag des Versuchsendes) geteilt durch die Intensität der Flox-Bande an Tag 0, **b** gegen die *Kollagen Typ I*-mRNA in den UUO-Nieren, **c** gegen die im FACS detektierten Kollagen-positiven Partikel in den UUO-Nieren und **d** gegen die Kollagen Typ I-positive Fläche in der Immunhistologie. Bis auf letzteren Punkt ist überall eine negative Korrelation dieser Werte zu erkennen, die im Falle der *Kollagen Typ I*-mRNA signifikant ist, d. h. je höher die Cre/Flox-Ratio ist, umso blasser wird die Flox-Bande in der PCR bzw. umso weniger Kollagen wird exprimiert. (n = 16)

geschlossen werden kann. Wenn jedoch ERT2-Cre homozygot vorliegt, wird es vermutlich stärker exprimiert als in heterozygotem Zustand und hätte einen effektiveren Knockout zur Folge.

Um diese These zu untersuchen, wurden die Cre/Flox-Ratios der ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl} - Mäuse betrachtet, die ab einem Alter von 5 Wochen das Tamoxifen-haltige Medizinalfutter für vier bzw. fünf Wochen erhielten, da bei diesen Tieren, wie bereits dargestellt, der Kollagen-Knockout ähnlich gut funktionierte.

Die Cre/Flox-Ratios der Tiere wurden gegen verschiedene Parameter aufgetragen: 1. gegen die Ratio aus der Intensität der Flox-PCR-Bande nach und vor Tamoxifengabe (mit DNA aus den Schwanzbiopsien); 2. gegen die in den UUO-Nieren exprimierte *Kollagen Typ I*-mRNA; 3. gegen die Zahl Kollagen-positiver Partikel im FACS und 4. gegen die Kollagen-positive Fläche in der Immunhistologie (s. Abb. 3.39).

In all diesen Analysen, mit Ausnahme der Immunhistologie, kann eine negative Korrelation zwischen dem jeweiligen Parameter und der Cre/Flox-Ratio festgestellt werden. Im Falle der qPCR ist diese Korrelation signifikant. Das heißt, je höher die Cre/Flox-Ratio ist, umso effektiver verläuft der induzierte Knockout bzw. umso weniger Kollagen wird in den UUO-Nieren synthetisiert.

3.4 Beobachtungen zu den gesundheitlichen Auswirkungen des induzierten Knockouts

Die bisherigen Daten zeigen, dass der mit Tamoxifen-haltigem Medizinalfutter induzierte Knockout von Kollagen Typ I effektiv die Expression von Kollagen Typ I in den UUO-Nieren reduzierte. Da ERT2-Cre im vorliegenden Mausmodell ubiquitär exprimiert wird und die Rekombination des Kollagen Typ I-Gens nicht nur in der DNA der UUO-Nieren, sondern auch der Schwanzbiopsien nach Tamoxifenapplikation nachgewiesen wurde, muss davon ausgegangen werden, dass auch in den übrigen Geweben der Knockout-Tiere kein oder nur noch wenig Kollagen Typ I exprimiert wurde. Die mangelnde Expression von Kollagen Typ I, welches ein bedeutendes Strukturprotein ist (s. Kap. 1.3), sowie die Gabe von Tamoxifen bergen jedoch die Möglichkeit einer gesundheitlichen Beeinträchtigung für die Tiere. Hinweise auf eine solche Beeinträchtigung können sich aus verschiedenen Faktoren ergeben, wie etwa einem veränderten Sozial- oder Fressverhalten, verminderter Fertilität oder erhöhten Sterberaten.

In der vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere aus diesem Grund engmaschig beobachtet, um das Auftreten inspektorisch auszumachender Schäden frühzeitig zu erkennen.

Schäden, die zu einem Versuchsabbruch geführt hätten, traten jedoch nicht auf.

Die Tiere wurden zudem am Tag nach der UUO gewogen. Wie in Abb. 3.40 zur Darstellung kommt, hatte die Behandlung mit Tamoxifen bei den Mäusen mit einem Alter von 15 Wochen zu Versuchsbeginn kein verringertes Gewicht der ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere gegenüber den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Mäusen zum Messzeitpunkt zur Folge. Im Gegensatz dazu konnte bei den Tieren mit einem Anfangsalter von 5 Wochen, also zu einem Zeitpunkt, als die Mäuse ihr Körperwachstum noch nicht abgeschlossen hatten, festgestellt werden, dass die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Mäuse am Tag nach der UUO jeweils signifikant weniger wogen als die gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} - oder ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Mäuse.

Weitere Tests zur Beurteilung der Gesundheit der Versuchstiere wurden nicht durchgeführt. Insgesamt ergab sich aus den Beobachtungen, dass der Kollagen-Knockout zwar keine unmittelbaren schweren oder letalen Schäden verursachte, jedoch durchaus Verzögerungen in der körperlichen Entwicklung der Knockout-Tiere zur Folge haben kann.

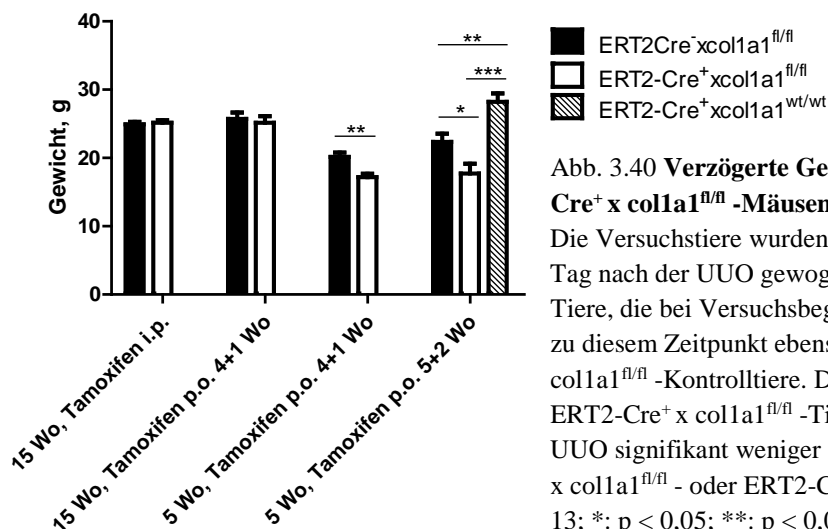


Abb. 3.40 **Verzögerte Gewichtsentwicklung von ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Mäusen mit Anfangsalter 5 Wochen.** Die Versuchstiere wurden für dieses Experiment am ersten Tag nach der UUO gewogen. Die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere, die bei Versuchsbeginn 15 Wochen alt waren, waren zu diesem Zeitpunkt ebenso schwer wie die ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Kontrolltiere. Die zu Beginn 5 Wochen alten ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere wogen am Tag nach der UUO signifikant weniger als die gleichaltrigen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} - oder ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Tiere. (n = 6-13; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ± SEM)

4 Diskussion

Mit dem Begriff Fibrose wird der narbige Umbau eines Gewebes im Sinne einer Ablagerung von Bindegewebe-proteinen v. a. in interstitielle Räume beschrieben. In der Regel tritt eine Organfibrose als immunologisch vermittelte Antwort auf eine (sub-)akut oder chronisch einwirkende Gewebeschädigung ein (3). Im Fall der Niere sind die Faktoren, welche eine Fibrose auslösen können, vielfältig und reichen von arterieller Hypertonie über Diabetes mellitus und chronisch entzündlichen Geschehen bis hin zu chronischen Harnabflussstörungen (2). Durch Apoptose und Nekrose geht im Zuge solcher Pathologien gesundes Nierengewebe verloren, an dessen Stelle Bindegewebe eingelagert wird. Die Funktion des geschädigten Organs nimmt stark ab, bis hin zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz (4).

Kollagen Typ I leistet den quantitativ größten Beitrag zu den abgelagerten Bindegewebsproteinen (4). Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Rolle des Kollagen Typ I im Fibroseprozess von großem Interesse und kann dazu beitragen, die Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln. Konkret ausgedrückt wird den Untersuchungen, die sich mit der Rolle von Kollagen Typ I in der Nierenfibrose beschäftigen, zumeist die Hypothese zugrunde gelegt, dass eine verminderte Kollagenablagerung das Fortschreiten der Fibrose-assoziierten Niereninsuffizienz abmildern und somit die Nierenfunktion länger aufrecht erhalten werden könne.

Das Interesse an einer Verminderung oder Verzögerung der Nierenfibrose im Verlauf einer Nierenschädigung spiegelt sich in der Vielzahl von Studien wider, die in diesem Sinne veröffentlicht wurden. Durch *Bersani-Amado et al.* wurde beispielsweise untersucht, ob Thalidomid oder Dexamethason die Ausbildung einer Fibrose in Mäusenieren hemmte. Es wurde postuliert, dass eine bei den mit Thalidomid behandelten Tieren beobachtete verminderte Ausbildung der Fibrose die bessere Nierenfunktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren bedingte (30). *Park et al.* stellten mit derselben Zielsetzung fest, dass die Applikation von Glucosamin-Hydrochlorid über eine Hemmung des TGF β -Signalweges zu verminderter Kollagen Typ I-Produktion in geschädigten Nieren führte (31); TGF β ist ein profibrotisches Protein, das zunächst inaktiv in der EZM vorliegt und beispielsweise durch Angiotensin II aktiviert werden kann (18). *Yoon et al.* zeigten in einer Studie, dass mit Tempol (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyl) behandelte Mäuse nach einer UUO weniger Kollagen in die Nieren einlagerten als nicht behandelte Tiere (32). Dies sind nur drei Beispiele von vielen, welche verdeutlichen, dass die Ablagerung von

Kollagen auf vielfältigen Wegen reguliert wird, die längst noch nicht alle verstanden sind und die nach wie vor intensiv untersucht werden. Die Beispiele zeigen gleichzeitig, dass zwar in vielen Studien versucht wurde, die Kollagen-Expression zu vermindern, dass dies aber keine Modelle mit der Intention waren, das Kollagen Typ I weitgehend vollständig und spezifisch auszuschalten. Die Behandlung von Versuchstieren mit bestimmten Medikamenten oder anderen chemischen Verbindungen führte nur zu einer moderaten Reduktion von bindegewebigen interstitiellen Ablagerungen und könnte neben der Kollagenablagerung noch weitere biologische Pathways unspezifisch mit beeinflusst haben. Der weitgehend vollständige und spezifische Verlust der Kollagenexpression in den geschädigten Nieren könnte jedoch weitere Erkenntnisse über die Abläufe und Folgen einer Nierenfibrose aufzeigen.

In der Tat wurden bereits Mausmodelle beschrieben, die eine sehr starke Reduktion der Expression von funktionsfähigem Kollagen Typ I zur Folge hatten. *Nagai et al.* beschrieben schon im Jahr 2000, dass das Hitzeschockprotein 47 (Hsp47) essentiell ist, um den Kollagenmolekülen eine stabile Tripelhelixstruktur zu verleihen. Mit einem Hsp47-Knockout waren die Mäuse auch Kollagen-defizient und verstarben daran bereits intrauterin (33). Ebenso verstarben Mäuse perinatal, denen MIA3 (Melanoma inhibitory activity protein 3), ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, fehlte. Ohne dieses Protein können verschiedene Kollagentypen, darunter Kollagen Typ I, nicht in den Extrazellulärraum sezerniert werden, sondern häufen sich intrazellulär an und verursachen den Zelltod, wie *Wilson et al.* publizierten (34).

Ein spezifisches und induzierbares Knockoutmodell von Kollagen Typ I wurde in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben.

Der Einsatz von Knockout-Mäusen stellt eine geeignete Möglichkeit dar, die Funktion und Bedeutung bestimmter Proteine zu untersuchen, da die Tiere das besagte Protein nicht exprimieren können (35). Ein solches Knockoutmodell existiert bereits für Kollagen Typ IV (Col4A3) und wurde von *Cosgrove et al.* genutzt, um das beim Menschen vorkommende Alport-Syndrom, das ein Nierenversagen durch einen genetischen Defekt des Kollagen IV hervorruft, zu imitieren und zu untersuchen. In diesem Modell fehlt den betroffenen Knockout-Mäusen das Col4A3-Gen vom Zeitpunkt der Konzeption an (36), sodass sie zu keinem prä- oder postnatalen Zeitpunkt Kollagen Typ IV bilden können.

Für einen Knockout von Kollagen Typ I kommt eine solche Art des Knockouts allerdings nicht in Frage, da eine ausgeprägte Kollagendefizienz prä- oder spätestens perinatal letal verläuft. Offenkundig spielt Kollagen Typ I während der Embryonalentwicklung eine zu

große Rolle, um darauf verzichten zu können. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Studie ein Mausstamm generiert, bei dem mithilfe eines ERT2-Cre/Flox-Systems erst postnatal der Knockout von Kollagen Typ I induziert wird. Zur Aktivierung dieses Systems muss Tamoxifen appliziert werden, welches in der Maus an das ERT2-Cre-Protein bindet und es in den Zellkern transloziert. Die Cre-Rekombinase schneidet daraufhin einen von zwei Flox-Sequenzen flankierten Abschnitt des Kollagen Typ I-Gens aus, der anschließend abgebaut wird, sodass Kollagen Typ I nicht länger exprimiert werden kann.

Ziel der vorliegenden Studie war, zu testen, ob und wie effizient der induzierbare Knockout von Kollagen Typ I mit dem ERT2-Cre/Flox-Modell verlief.

Zu diesem Zweck wurde auf die UUO zurückgegriffen, welche ein zuverlässig reproduzierbares und oft beschriebenes Verfahren zur Induktion einer Nierenfibrose in Mäusen und anderen Spezies ist (17). Im Rahmen der UUO wird durch die Ligatur eines Ureters innerhalb weniger Tage eine ipsilaterale Nierenfibrose hervorgerufen, sodass sie sich gut zur Untersuchung eines induzierten Kollagen-Knockouts eignet. Anhand der Nieren, v. a. der kompromittierten UUO-Niere, wurde analysiert, ob der induzierte Knockout von Kollagen Typ I in der erwarteten Weise verlaufen war und die Kollagen-Knockout-Mäuse (Genotyp ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}) somit im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger Kollagen Typ I in die UUO-Nieren einlagerten.

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Versuchsanordnungen erstellt, um zu eruieren, welche Art der Applikation von Tamoxifen erforderlich ist, um wirkungsvoll den Knockout zu induzieren. In der Literatur werden viele unterschiedliche Anwendungsschemata für Tamoxifen beschrieben. Bei *Xu et al.* etwa wurde Tamoxifen mit einer Konzentration von 20mg/ml in Öl gelöst. Den Mäusen wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen 1mg/Tag Tamoxifen *i.p.* verabreicht, um einen Knockout von *Twist1* hervor zu rufen (37). Bei *Ortiz et al.* dagegen wurde Versuchsmäusen einmalig 100mg/kg Tamoxifen in Öl *i.p.* injiziert (38). Bei *Dworniczak et al.* wiederum wurde Tamoxifen in einem Sonnenblumenöl/Ethanol-Gemisch gelöst, von welchem die Tiere bis zu 1mg/40g Körpergewicht an fünf aufeinander folgenden Tagen *i.p.* erhielten (39).

In der vorliegenden Studie wurde schließlich entschieden, orientierend einem Behandlungsschema zu folgen, wie es bei *Ventura et al.* (24) beschrieben wird. Diesem Schema zufolge erhielten die Versuchsmäuse an den Tagen 0, 3, 5 und 7 des Versuches 1mg Tamoxifen (100µl eines 10mg/ml Tamoxifen-in-Öl-Gemisches) über intraperitoneale Injektion. An Tag 14 erfolgte die Durchführung der UUO, an Tag 21 wurde der Versuch

beendet. Mit den in Kap 2.2 dargelegten Methoden erfolgte daraufhin die Analyse der Kollagenablagerungen in den Nieren der Knockout-Mäuse (ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}) sowie der Kontrollmäuse (ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}). Sowohl in der qPCR- als auch in der FACS- und der (immuno-)histologischen Analyse mit Trichrom- und Kollagen Typ I-Färbung zeigte sich, dass die Knockout-Mäuse kaum weniger Kollagen in die UUO-Nieren einlagerten als die gleich behandelten Kontrolltiere, was den Schluss zuließ, dass die *i.p.*-Behandlung mit Tamoxifen in dieser Form nicht in ausreichendem Maße den Kollagen-Knockout herbeigeführt hatte.

Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass das Tamoxifen in zu geringer Menge aus dem Peritonealraum absorbiert wurde und daher für einen effektiven Kollagen-Knockout in zu geringer Konzentration im Gewebe vorlag. Eventuell hätte das Tamoxifen zudem über einen längeren Zeitraum als über sieben Tage hinweg appliziert werden müssen. Das angegebene Versuchsschema war zwar geeignet für das Versuchsziel von *Ventura et al.*, jedoch offenkundig nicht ausreichend für den ubiquitären Knockout von Kollagen Typ I. Wie *Coleman et al.* bereits feststellten, können verschiedene Mausstämme und Zielgene unterschiedliche Dosierungen in der Tamoxifenanwendung erforderlich machen (40).

Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine andere Art der Tamoxifenapplikation getestet, um den Kollagen-Knockout zu induzieren. Bei *Kurtz et al.* wird die perorale Anwendung von Tamoxifen beschrieben. Dabei wurde den Versuchsmäusen zum Zweck eines induzierten Knockouts von Connexin40 vier Wochen lang Medizinalfutter mit einer Tamoxifenkonzentration von 400mg/kg angeboten wurde (27).

Aufbauend darauf wurden zwei weitere Versuchsschemata erstellt: 1. Vierwöchige Applikation von Medizinalfutter gefolgt von der UUO eine Woche später sowie Versuchsende eine weitere Woche später (4+1-Wochenschema); 2. Fünfwöchige Applikation von Medizinalfutter gefolgt von der UUO zwei Wochen später sowie Versuchsende eine weitere Woche später (5+2-Wochenschema). Darüber hinaus wurde das 4+1-Wochenschema sowohl mit älteren (Anfangsalter 15 Wochen) als auch mit jüngeren (Anfangsalter 5 Wochen) Versuchstieren durchgeführt.

Anhand der quantitativen Analysen in den zu Versuchsende entnommenen UUO-Nieren stellte sich nach der Anwendung von Tamoxifen in Medizinalfutter heraus, dass die Kollagen-Knockout-Tiere signifikant weniger *Kollagen-Typ-I*-mRNA exprimierten als die Kontrolltiere. Im FACS zeigte sich eine geringere Infiltration des Nierenparenchyms durch Kollagen-positive Zellen, und auch in der Immunhistologie gegen Kollagen Typ I war hochsignifikant weniger interstitiell abgelagertes Kollagen nachzuweisen.

Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, dass der Knockout mit hoher Effektivität stattgefunden hatte. Ergänzend erfolgte daher der Versuch einer groben Quantifizierung der Effektivität der Rekombination im ERT2-Cre/flox-System mittels Vergleich der Intensität der PCR-Banden für Flox vor und nach Tamoxifengabe (Näheres s. Kap. 2.2.3). Der Rückgang der Fluoreszenzintensität der Banden für Flox nach der Tamoxifenapplikation, der aus theoretischer Sicht proportional zur Anzahl rekombinierter Kollagen-Genloci sein sollte, erfolgte bis auf etwa ein Viertel bis ein Achtel des Ausgangswertes der ubiquitären Kollagen Typ I-Knockout-Tiere. Obgleich die PCR eine Methode mit nur eingeschränkter quantitativer Aussagekraft ist, stellte sich die Verminderung des PCR-Produkts nach der Knockout-Induktion eindrucklich und kohärent mit den übrigen Versuchsergebnissen dar und bezeugte somit ein ausgedehntes Rekombinationsgeschehen.

Im Zuge der Analyse der funktionell verbleibenden Fähigkeit zur Kollagensynthese nach der Induktion des Knockouts wurden zudem mehrere Faktoren ermittelt, die Einfluss auf die Effektivität des Kollagen-Knockouts nahmen. Es zeigte sich unter anderem, dass das Ansprechen der induzierbaren Kollagen Typ I-Knockout-Mäuse auf die Gabe des Tamoxifen von ihrem Alter zu Versuchsbeginn abhing. Tiere, die zu Anfang der vierwöchigen Tamoxifenapplikation bereits 15 Wochen alt waren, exprimierten später auf den verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese zwar deutlich weniger Kollagen Typ I in den UUO-Nieren als die gleichaltrigen Kontrolltiere; jedoch lagen die Kollagen-Werte in der Immunhistologie noch deutlich über dem Kollagen-Basisniveau, das in den KO-Nieren vorlag. Die Analyse der *Kollagen Typ I*-mRNA konnte in dieser Altersgruppe keine signifikante Erniedrigung selbiger mRNA bei den Knockout-Mäusen nachweisen.

Die zu Versuchsbeginn jüngeren Tiere (Alter 5 Wochen) wiesen dagegen nach der vierwöchigen Tamoxifenapplikation signifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA auf als die Kontrolltiere, produzierten weniger intrazelluläres Kollagen in den UUO-Nieren und lagerten so wenig extrazelluläres Kollagen ab, dass in den KO-Nieren der Knockout-Mäuse kaum weniger Kollagen nachgewiesen werden konnte. Es kann folglich festgestellt werden, dass ein geringeres Alter der Versuchstiere bei Induktion des Knockouts zu einem weitreichenderen Verlust der Fähigkeit zur Kollagenbiosynthese führte.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Effektivität des Knockouts war die Dauer der Tamoxifenapplikation. Die Ergebnisse nach dem 5+2-Wochenschema ließen vermuten, dass im Vergleich zur 4+1-Versuchsanordnung ein noch effektiverer, annähernd vollständiger Knockout stattgefunden hatte. Die Intensität der PCR-Banden für Flox sank bei den Knockout-Tieren nach der fünföchigen Tamoxifenapplikation auf ca. ein Achtel des

Ausgangswertes ab. Ihre UUO-Nieren wiesen einen Gehalt an *Kollagen Typ I*-mRNA auf, der nur wenig höher war als in den KO-Nieren derselben Tiere sowie der Kontrolltiere. Am eindrücklichsten präsentierte sich die gegen Kollagen gerichtete Immunhistologie, mit der in den UUO-Nieren der Knockout-Tiere nicht signifikant mehr Kollagen nachgewiesen werden konnte als in deren KO-Nieren. Zumindest funktionell ließ sich somit auf einen bestmöglichen Kollagen-Knockout schließen. Der Einsatz einer zweiten Kontrollgruppe (Genotyp ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}) konnte diese Ergebnisse durchgehend bestätigen. Auch diese Tiere exprimierten hochsignifikant mehr Kollagen in den UUO-Nieren als die induzierbaren Kollagen-Knockout-Mäuse.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Tiere bezüglich der Kollagen Typ I-Expression leichte Abweichungen auch von den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Mäusen zeigten. Sie exprimierten mehr *Kollagen Typ I*-mRNA, deutlich mehr intrazellulär nachweisbares Kollagen und etwas mehr immunhistologisch nachweisbares Kollagen. Möglicherweise übte bereits das Einbringen der Flox-Sequenzen in den Kollagen Typ I-Lokus einen leichten Effekt auf die Expression von Kollagen aus. Alternativ könnte die vermehrte Kollagenexpression auf eine höhere Zahl an Myofibroblasten zurückzuführen sein, über die die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Tiere verfügten, wie aus den leicht erhöhten Werten von α -SMA in der Immunhistologie geschlossen werden kann (s.u.).

Der dritte Einflussfaktor schließlich war die Cre-Flox-Ratio, die aus PCR-Banden für ERT2-Cre und Flox vor der ersten Tamoxifengabe ermittelt wurde (Details s. Kap. 2.2.3). Je höher sie war, desto effektiver verlief der Knockout. Zurückführen lässt sich dieser Zusammenhang vermutlich auf die höhere Wahrscheinlichkeit einer Homozygotie für ERT2-Cre bei hoher Cre-Flox-Ratio, aus welcher eine vermehrte Expression von ERT2-Cre und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Rekombination im Zellkern resultierte.

Angesichts der augenscheinlich hohen Effektivität des Kollagen-Knockouts nach der peroralen Tamoxifenapplikation mittels Medizinalfutter war es sinnvoll, die Spezifität des Knockout-Geschehens zu prüfen. Um die Rolle von Kollagen Typ I differenziert betrachten zu können, muss sichergestellt sein, dass die Versuchsanordnung zur Induktion des Knockouts nach Möglichkeit ausschließlich die Expression von Kollagen Typ I verändert und nur wenige Nebeneffekte aufweist, die nachfolgende Versuchsergebnisse verfälschen könnten. Manche versuchsbedingte Veränderungen des Organismus ließen sich allerdings nicht vermeiden, da beispielsweise allein schon die Gabe von Tamoxifen Einflüsse auf den Stoffwechsel der Maus hat, wie etwa *Zhong et al.* ausführlich darlegten. Tamoxifen verändert

in gewissen Dosen den Knochenstoffwechsel und führt bereits nach kurzer Zeit zu einer erhöhten Knochendichte (41). Es beeinflusst darüber hinaus die Funktion der Ovarien (42) und kann durch die Veränderung von Bindegewebestrukturen die Entstehung von Hernien begünstigen (43). Zur Kompensation dieser potentiellen Nebenwirkungen wurden sowohl die Knockout-Mäuse als auch die Kontrollmäuse auf dieselbe Weise mit Tamoxifen behandelt. Auswirkungen auf den Organismus und die Fibrosierung, die auf unspezifischen Prozessen im Rahmen des Rekombinationsgeschehens des Kollagen-Gens beruhen, galt es zu vermeiden. Repräsentativ für viele Fibrose-assoziierte Proteine wurde das Strukturprotein Fibronectin betrachtet, das eng mit Kollagen assoziiert ist (8) und daher am ehesten von einem Kollagen-Knockout mit beeinflusst werden könnte. Vor allem im Rahmen der mRNA-Analyse der UUO-Nieren zeigten sich immer wieder signifikant erniedrigte Werte für *Fibronectin*-mRNA bei den Knockout-Mäusen, was darauf hinweisen könnte, dass mit einer erniedrigten Kollagenexpression auch die Synthese von Fibronectin zurückgefahren wird. In der Immunhistologie war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt. Lediglich die UUO-Nieren der älteren nach dem 4+1-Wochenschema behandelten Knockout-Mäuse synthetisierten signifikant weniger Fibronectin als die Nieren der Kontrolltiere. In allen anderen Versuchsanordnungen trat dieser Effekt nicht auf, sodass in den Nieren der Knockout- und der Kontrolltiere jeweils gleich viel Fibronectin vorlag.

Es bleibt dahingestellt, welcher der beiden Methoden, der mRNA-Analyse oder der Immunhistologie, in diesem Zusammenhang die größere Bedeutung zugemessen werden sollte. Einerseits bewegt sich der *Fibronectin*-mRNA-Gehalt in den UUO-Nieren in einem überaus niedrigen Bereich, sodass nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass die TaqMan-PCR in diesem Messbereich noch valide Werte ermittelt. Weitere Zweifel an der Aussagekraft der mRNA-Analyse liefern die ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{wt/wt} -Tiere, die in ihren Nieren noch weniger *Fibronectin*-mRNA exprimierten als die ERT2-Cre⁺ x coll1a1^{fl/fl} -Tiere und den Verdacht aufkommen lassen, dass die Expression eher vom Genotyp bestimmt als durch den Kollagen-Knockout beeinflusst wird.

Andererseits bildet die mRNA-Analyse eher eine Momentaufnahme vom Stoffwechsel eines Gewebes ab, während die Immunhistologie Proteine darstellt, die bereits über einen langen Zeitraum ins Gewebe eingelagert worden sein können. Insofern könnte die mRNA-Analyse einen besseren Blick auf die momentane Situation in der Niere gewähren und damit von höherer Aussagekraft sein als die Immunhistologie. Die Antwort darauf kann im Rahmen der vorliegenden Studie nicht gegeben werden, jedoch wäre es mit Sicherheit interessant, die Wechselbeziehungen zwischen Kollagen Typ I und Fibronectin näher zu untersuchen. Das

Thema wurde beispielsweise von *Gildner et al.* bereits aufgegriffen. Sie konnten zeigen, dass die Anwesenheit von Kollagen Typ I die Konfiguration von Fibronectin sowie die Fibronectin-abhängige Zellproliferation beeinflusst (44), was sicherlich nicht die einzige Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist.

Zudem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt, ob der beobachtete Rückgang der Kollagen-Expression in den UUO-Nieren der Knockout-Mäuse ausschließlich auf den genomischen Knockout zurückzuführen war oder durch eine verminderte Anzahl Kollagen-produzierender Zellen mit verursacht wurde. Hierfür erfolgte die Analyse von α -SMA sowie von CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen, deren erniedrigte Anzahl im Nierengewebe der Knockout-Mäuse für eine nicht-rekombinationsspezifische Verminderung der Kollagen-Synthese spräche.

Da α -SMA als Marker für Kollagen-produzierende Myofibroblasten gilt (10), ist bei einer vermehrten Expression von α -SMA im Gewebe von einer erhöhten Zahl von Myofibroblasten auszugehen, welche wiederum vermehrt EZM produzieren können. Durch die Immunhistologie gegen α -SMA zeigte sich, dass die ERT2-Cre⁺ x col1a1^{fl/fl}-Mäuse ebenso viel α -SMA in den UUO-Nieren exprimierten wie die ERT2-Cre⁻ x col1a1^{fl/fl}- und ERT2-Cre⁺ x col1a1^{wt/wt}-Tiere. Offenkundig nahm die Applikation von Tamoxifen bzw. die Induktion des Kollagen-Knockouts keinen Einfluss auf das Ausmaß, in welchem sich bestimmte Vorläuferzellen (Fibrozyten, Fibroblasten etc.) zu Myofibroblasten differenzierten. Es darf folglich davon ausgegangen werden, dass die verminderte Expression von Kollagen Typ I in den Nieren ausschließlich durch die genomische Rekombination herrührte und nicht von einer geringeren Anzahl von Myofibroblasten mit verursacht wurde.

Ergänzend wurden in die Nieren infiltrierende Zellen hämatopoietischen Ursprungs untersucht. Zellen, die positiv für die entsprechenden Marker CD45 und CD11b sind, migrieren im Zuge des durch die UUO ausgelösten Entzündungsprozesses in das Nierengewebe und können als Vorläufer für Myofibroblasten fungieren und somit die Ausprägung der Fibrose beeinflussen (10, 45).

Bei der Versuchsanordnung mit dem *i.p.* applizierten Tamoxifen infiltrierten in die UUO-Nieren der Kollagen-Knockout-Tiere deutlich weniger CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen als in die UUO-Nieren der Kontrolltiere. Gleichzeitig exprimierten beide Versuchsgruppen ähnlich viel Kollagen Typ I in den fibrotischen Nieren. In der Versuchsanordnung mit Tamoxifen über Medizinalfutter im 4+1-Wochenschema zeigte sich bei den zu Versuchsbeginn 15 Wochen alten Mäusen eine ähnliche, aber weniger stark ausgeprägte

Tendenz hin zu verminderter Leukozyteninfiltration in den Knockout-Tieren. Mit den jüngeren Tieren in derselben Versuchsanordnung und im 5+2-Wochenschema ließ sich kein Unterschied in der Leukozyteninfiltration mehr nachweisen bzw. sogar eine vermehrte Infiltration von CD45⁺/CD11b⁺ Zellen in UUO-Nieren der Knockout-Tiere, sodass die Produktion von Kollagen in den Knockout-Tieren stark reduziert war, obwohl dieselbe Zahl von CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen wie in den Kontrolltieren eingewandert war. Zudem wiesen die ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt} -Tiere ein völlig anderes Verteilungsmuster von CD45⁺/CD11b⁻ und CD45⁺/CD11b⁺ Zellen auf. Möglicherweise weisen die ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl} -Tiere also primär genotypisch bedingt eine geringere Zellinfiltration auf als die ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} -Tiere. Bei einer wirksamen Knockout-Induktion von Kollagen im 4+1- und 5+2-Wochenschema migrierten dann kompensatorisch sogar mehr Zellen in die UUO-Nieren, ohne dass dies aber eine vermehrte Produktion von Kollagen zur Folge hatte. Zusammenfassend ließ sich folglich keine andere Ursache für die verminderte Kollagen-Einlagerung in die UUO-Nieren der Knockout-Tiere finden als die erfolgreich induzierte Rekombination des Kollagen Typ I-Gens.

Nebst der Analyse von Proteinen und Zellmarkern wurden im Rahmen der vorliegenden Studie auch die Auswirkungen des Kollagen-Knockouts auf die Morphologie der Nieren im H.E.-gefärbten Schnittpräparat untersucht. Für die systematische Analyse von UUO-Nieren im H.E.-Präparat existieren in der Literatur kaum Beispiele. Eines der wenigen beschriebenen Bewertungssysteme von H.E.-Präparaten nach UUO stammt von *Li et al.* und legt unter anderem sein Augenmerk auf die Zellinfiltration in die Niere, die interstitielle Fibrose und die Erweiterung der Nierentubuli (46). Die Zellinfiltration wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit allerdings bereits durch die FACS-Analyse untersucht; die interstitielle Fibrose wurde ausreichend und zuverlässiger durch die oben erwähnten Methoden untersucht, und die Erweiterung der Tubuli stellt eine sehr variable und wenig reproduzierbare Messgröße dar, da sie die Rindenbereiche der Niere unterschiedlich stark betrifft (eigene Beobachtungen). Aus diesem Grund wurde ein eigenes Scoring-System entwickelt, das neue Erkenntnisse, die am ehesten einer H.E.-Färbung bedürfen und nicht bereits durch andere Methoden erbracht wurden, bieten konnte. Das neue Scoring-System berücksichtigte das Verhalten des Bowman'schen Kapselraumes und der glomerulären Kapillarschlingen, die Atrophie der distalen Nierentubuli sowie die Ausprägung eines fibrotischen Saumes rund um die Bowman'sche Kapsel nach UUO.

Allgemein ließ sich feststellen, dass nach der UUO die Breite des Bowman'schen Kapsel-

raumes vermutlich aufgrund der veränderten Druckverhältnisse im Vergleich zu KO-Nieren oder naiven Nieren abnahm und dass die Kapillarschlingen, ebenfalls aufgrund der Druckverhältnisse, sowohl kollabierten als auch zusätzlich durch die Proliferation des Mesangiums verengt wurden. Die Zellen der distalen Tubuli atrophierten nach der UUO auf etwa zwei Drittel bis die Hälfte ihres ursprünglichen Diameters. Des Weiteren bildeten sich in den UUO-Nieren eosinophile, bindegewebige interstitielle Ablagerungen, die sich unter anderem in der Ausbildung eines fibrotischen Randsaumes rund um die Glomeruli ausdrückten. Im Vergleich zwischen UUO-Nieren der Knockout-Mäuse und der Kontrolltiere zeigte sich, dass der fibrotische Saum rund um die Glomeruli bei den ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl}-Tieren ebenso wie bei den ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}-Tieren deutlich dicker ausgeprägt war als bei den Knockout-Mäusen. Dies kann als ein direkter Effekt des Mangels an Kollagen Typ I, aus dem der fibrotische Saum vermutlich hauptsächlich besteht, gedeutet werden. Die übrigen Parameter waren nach der UUO in allen Versuchsgruppen gleich stark ausgeprägt.

Eine Schwäche all dieser Ergebnisse ist sicherlich, dass die Versuchsgruppen in den jeweiligen Versuchsanordnungen weder immer gleich groß waren noch dass alle Versuchstiere das gleiche Geschlecht hatten. Im Rahmen des Umstandes, dass auf Mäuse aus einer eigenen Zucht zurückgegriffen wurde, war es schwierig, größere Gruppen an Mäusen gleichen Alters und gleichen Geschlechts zusammenzustellen. Es ist durchaus möglich, dass Männchen und Weibchen unterschiedlich auf die Versuchsumstände reagierten. Bei Ratten etwa wurde eine geschlechtsspezifische Diskrepanz in der Reaktion auf eine UUO beschrieben. Männliche Ratten wiesen demnach postobstruktiv eine geringere GFR und mehr Apoptosen im Tubulussystem auf als Weibchen (47). Daher wurde in der Versuchsplanung darauf geachtet, dass zumindest eine vergleichbare Anzahl an männlichen und weiblichen Tieren in die Knockout- und die Kontrollgruppen eingeschlossen wurden.

Kompensiert wurde diese Schwäche in der Versuchskonzeption zudem durch die vielen verschiedenen Methoden, mit denen der Nachweis von Kollagen Typ I im Zielorgan erfolgte. Diese Methoden zeigten durchweg kohärente Ergebnisse, sodass dennoch von einer hohen Validität der Studie ausgegangen werden darf.

Es wurde somit ein induzierbares Knockout-Modell von Kollagen Typ I etabliert, das in vielen Studien und Modellen, die sich mit Fibrose beschäftigen, zur Anwendung kommen kann. Um nur einige Beispiele zu nennen, wären dies etwa das Modell der reversiblen UUO, bei der eine Niere mit obstruiertem Harnleiter wieder frei gegeben und auf die Wiederaufnahme ihrer Funktion hin geprüft wird, Fibrosemodelle anderer Organe oder Modelle mit

Knochenmarktransplantationen, die auf die Herkunftsbestimmung der Myofibroblasten abzielen.

Gegebenenfalls wäre zu empfehlen, das Schema der Tamoxifenapplikation konkret dem späteren Verwendungszweck anzupassen. Wie oben dargestellt, verlief die Induktion des Kollagen Typ I-Knockouts mit der Tamoxifengabe über Medizinalfutter sowohl im 4+1-Wochenschema als auch im 5+2-Schema in allen Altersgruppen mindestens zufriedenstellend, mit jüngeren Tieren besser als mit älteren und mit fünfwöchiger Gabe tendenziell besser als mit vierwöchiger. Ein effektiverer Knockout von Kollagen Typ I zog gleichzeitig eine stärkere körperliche Beeinträchtigung der Versuchstiere nach sich. Vor allem die Mäuse, die ab einem Alter von fünf Wochen für fünf Wochen das Medizinalfutter erhielten, erfuhren einerseits einen ausgezeichneten Knockout von Kollagen Typ I und blieben andererseits deutlich in ihrer Gewichtsentwicklung gegenüber den Kontrolltieren zurück. Es steht zu befürchten, dass solche Tiere späteren belastenden Behandlungen wie etwa einer reversiblen UUO nicht gewachsen sind, sodass für solche Versuchsanordnungen eine Induktion des Knockouts über vier Wochen hinweg und an acht bis zehn Wochen alten Mäusen sinnvoller wäre. Tiere, die als Knochenmarkspender dienen sollen, sollten dagegen möglichst früh über fünf Wochen mit Tamoxifen behandelt werden, um die Effektivität der Rekombination sicher zu stellen.

Eine derartige Anpassung des Induktionsschemas erscheint unabdingbar angesichts der herausragenden Rolle, die Kollagen Typ I im gesamten Wirbeltierorganismus spielt und die es weiterhin zu erforschen gilt.

5 Zusammenfassung

Bis zu zehn Prozent aller Erwachsenen sind niereninsuffizient und teilweise durch Nierenersatzverfahren in ihrer Lebensqualität stark eingeschränkt. Ausgehend von einer Vielzahl an Ätiologien kommt es in der geschädigten Niere zunehmend zu Atrophie und dem Verlust von Glomeruli und Nierentubuli und im Gegenzug zu einer Anhäufung von EZM. Die Hauptkomponente der bindegewebigen EZM ist Kollagen Typ I, welches u. a. von Myofibroblasten synthetisiert wird.

Da viele Mechanismen der Nierenfibrose bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz weiterhin unklar sind, ist es sinnvoll, die Funktion von Kollagen Typ I als bedeutendem Bestandteil des fibrotischen Materials näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein induzierbares Knockoutmodell für Kollagen Typ I in der Maus etabliert. Zur Anwendung kam ein ubiquitär exprimiertes ERT2-Cre/loxP-System, durch welches bei der Applikation von Tamoxifen die Rekombination des Kollagen Typ I-Gens in allen Körperzellen eingeleitet wurde.

Es wurden unterschiedliche Applikationsformen von Tamoxifen getestet. Während die viermalige *i.p.* Anwendung von Tamoxifen in Öl keine signifikante Reduktion der Kollagenexpression bei den Knockout-Tieren (ERT2-Cre⁺ x colla1^{fl/fl}) hervorrief, konnte nachgewiesen werden, dass eine vier- oder fünfwöchige Darreichung von Tamoxifen in Medizinalfutter einen effektiven Knockout von Kollagen Typ I zur Folge hatte.

Die Versuchstiere wurden hierfür nach der Tamoxifenapplikation einer UUO unterzogen, die eine ipsilaterale Nierenfibrose induzierte. Die Untersuchung der UUO-Nieren zeigte, dass die Knockout-Tiere hochsignifikant weniger *Kollagen Typ I*-mRNA exprimierten, weniger Kollagen-positive Partikel in der FACS-Analyse aufwiesen und deutlich weniger immunhistologisch nachweisbares Kollagen Typ I in das Interstitium der Niere einlagerten als die Mäuse der Kontrollgruppen mit den Genotypen ERT2-Cre⁻ x colla1^{fl/fl} und ERT2-Cre⁺ x colla1^{wt/wt}. Gleichzeitig ergaben sowohl die immunhistologische Analyse von α -SMA als Marker für Myofibroblasten als auch die FACS-Analyse von CD45⁺CD11b⁺ Zellen als mögliche Vorstufen Kollagen-produzierender Zellen, dass dem Rückgang der Kollagensynthese keine verminderte Zahl von Kollagen-produzierenden Zellen zugrunde lag. Auch die Expression von Fibronektin wurde nicht durch den Kollagen-Knockout beeinflusst. Nach ausführlicher Untersuchung kann das beschriebene Modell des induzierbaren Knockouts von Kollagen Typ I zu weiterem Erkenntnisgewinn bezüglich des Fibroseprozesses verwendet werden.

6 Literatur

1. Rajeev R, Garabed E. What is Chronic Kidney Disease? In: Arici M, editor. Management of Chronic Kidney Disease: A Clinician's Guide. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 3–13.
2. KDOQI CKD Guidelines; 2013 [cited 2015 Jun 27]. Available from: URL: http://www2.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm.
3. Feehally J, Flöge J, Johnson RJ. Comprehensive clinical nephrology. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Mosby, Elsevier; 2007. Available from: URL: [http://www.regensburger-katalog.de/InfoGuideClient.ubrsis/start.do?Login=igubr&Query=540="978-0-323-04602-2"](http://www.regensburger-katalog.de/InfoGuideClient.ubrsis/start.do?Login=igubr&Query=540=\).
4. Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL, Brenner BM, editors. Brenner & Rector's The Kidney. 9. ed.; 2012.
5. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 2014; 5:123.
6. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.
7. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, editors. Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Innere Organe ; 118 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2009.
8. Rassow J, editor. Biochemie: 67 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. (Duale Reihe).
9. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 2003; 92(8):827–39.
10. Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 2015; 87(2):297–307.
11. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011; 92(3):158–67.
12. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Göbel N, Brühl H et al. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int.* 2013; 84(1):78–89.
13. Kida Y, Duffield JS. Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2011; 38(7):467–73.
14. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(3):178–96.
15. Li J, Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15(5):507–12.
16. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009; 75(11):1145–52.
17. Truong LD, Gaber L, Eknayan G. Obstructive uropathy. *Contrib Nephrol* 2011; 169:311–26.

18. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2015; 8:7.
19. Schnieke A, Harbers K, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the alpha 1(I) collagen gene. *Nature* 1983; 304(5924):315–20.
20. Guan C, Ye C, Yang X, Gao J. A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis* 2010; 48(2):73–85.
21. Kwan K. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 2002; 32(2):49–62.
22. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; 26(2):99–109.
23. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(22):4324–7.
24. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007; 445(7128):661–5.
25. Mouse Gene Col1a1 (uc007kzn.1) Description and Page Index [cited 2015 Jun 21]. Available from: URL: http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc007kzn.1&hgg_prot=P11087&hgg_chrom=chr11&hgg_start=94936269&hgg_end=94951856&hgg_type=knownGene&db=mm10&hgsid=208664436_e7OmxJtRb7bfyR3TjyY8lMDmUhMP.
26. Netzker R. Genexpression. In: Rassow J, editor. *Biochemie: 67 Tabellen*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. p. 432–72 (Duale Reihe).
27. Gerl M, Vöckl J, Kurt B, van Veen, Toon A B, Kurtz A, Wagner C. Inducible deletion of connexin 40 in adult mice causes hypertension and disrupts pressure control of renin secretion. *Kidney Int.* 2015; 87(3):557–63.
28. Luttmann W, editor. *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.; 2009. (Der Experimentator).
29. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984; 25(4):689–95.
30. Bersani-Amado LE, Dantas JA, Damiao MJ, Rocha BA, Besson JCF, Bastos RL et al. Involvement of cytokines in the modulation and progression of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in C57BL/6 mice: effects of thalidomide and dexamethasone. *Fundam Clin Pharmacol* 2016; 30(1):35–46.
31. Park J, Lee S, Ooshima A, Yang K, Kang JM, Kim Y et al. Glucosamine hydrochloride exerts a protective effect against unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by attenuating TGF-beta signaling. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91(11):1273–84.

32. Yoon HE, Kim SJ, Kim SJ, Chung S, Shin SJ. Tempol attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction: the role of PI3K-Akt-FoxO3a signaling. *J Korean Med Sci* 2014; 29(2):230–7.
33. Nagai N, Hosokawa M, Itohara S, Adachi E, Matsushita T, Hosokawa N et al. Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol* 2000; 150(6):1499–506.
34. Wilson DG, Phamluong K, Li L, Sun M, Cao TC, Liu PS et al. Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *J Cell Biol* 2011; 193(5):935–51.
35. Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L et al. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 2002; 11(3):115–32.
36. Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ et al. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 1996; 10(23):2981–92.
37. Xu Y, Xu Y, Liao L, Zhou N, Theissen SM, Liao X et al. Inducible knockout of Twist1 in young and adult mice prolongs hair growth cycle and has mild effects on general health, supporting Twist1 as a preferential cancer target. *Am J Pathol* 2013; 183(4):1281–92.
38. Ortiz O, Wurst W, Kuhn R. Reversible and tissue-specific activation of MAP kinase signaling by tamoxifen in Braf(V637)ER(T2) mice. *Genesis* 2013; 51(6):448–55.
39. Dworniczak B, Skryabin B, Tchinda J, Heuck S, Seesing F, Metzger D et al. Inducible Cre/loxP recombination in the mouse proximal tubule. *Nephron Exp Nephrol* 2007; 106(1):e11–20.
40. Coleman JLJ, Brennan K, Ngo T, Balaji P, Graham RM, Smith NJ. Rapid Knockout and Reporter Mouse Line Generation and Breeding Colony Establishment Using EUCOMM Conditional-Ready Embryonic Stem Cells: A Case Study. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6:105.
41. Zhong ZA, Sun W, Chen H, Zhang H, Lay YE, Lane NE et al. Optimizing tamoxifen-inducible Cre/loxP system to reduce tamoxifen effect on bone turnover in long bones of young mice. *Bone* 2015; 81:614–9.
42. Yu M, Liu W, Wang J, Qin J, Wang Y, Wang Y. Effects of tamoxifen on autosomal genes regulating ovary maintenance in adult mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22(24):20234–44.
43. Ma X, Liu Y, Wang Q, Chen Y, Liu M, Li X et al. Tamoxifen induces the development of hernia in mice by activating MMP-2 and MMP-13 expression. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(5):1038–48.
44. Gildner CD, Roy DC, Farrar CS, Hocking DC. Opposing effects of collagen I and vitronectin on fibronectin fibril structure and function. *Matrix Biol* 2014; 34:33–45.
45. Chen G, Lin S, Chen J, He L, Dong F, Xu J et al. CXCL16 recruits bone marrow-derived fibroblast precursors in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(10):1876–86.

46. Li S, Ye J, Deng Z, Yu L, Gu X, Liu Q. Ginsenoside-Rg1 inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis after unilateral ureteral obstruction in rats. *Ren Fail* 2015; 37(5):890–5.
47. Quinlan MR, Cronin P, Daly PJ, Watson RWG, Manucha W, Docherty NG et al. A gender comparison of postobstructive injury in the rat kidney. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33(4):266–73.

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CTGF	Connective tissue growth factor
DNA	Desoxyribonucleic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndoMT	Endothelial-mesenchymale Transition
ERT2	Estrogen receptor T2
FACS	Flourescence-activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
KDOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
KO	Kontralateral
LAP	Latency-associated Peptide
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
OP	Operation
PCR	Polychain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor β
qPCR	Quantitative Polychain Reaction
s.	siehe
SEM	Standard error oft the mean
Tab.	Tabelle
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
V.	<i>Vena</i>

VEGF	Vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
Wo	Woche
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
α -SMA	α -Smooth muscle actin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zu guter Letzt bei allen bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst natürlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Mack, der mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und stets als Ansprechpartner für die weitere Projektplanung und Auswertestrategien zur Verfügung stand. Die Betreuung war sehr engmaschig und hätte in meinen Augen nicht besser sein können.

Danke auch an Prof. Dr. Hayo Castrop, der sich freundlicherweise als Zweitgutachter zur Verfügung stellte.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Gabriela Schiechl-Brachner, die mich zu Anfang in das Forschungsthema und die meisten Methoden einführte und mir im weiteren Verlauf stets mit großer Ideenvielfalt und klugen Ratschlägen zur Seite stand. Mit grenzenloser Geduld und nahezu akribisch half sie mir außerdem bei der schriftlichen Ausarbeitung der Doktorarbeit.

Vielen, vielen Dank auch an die anderen Kollegen aus der AG Mack, mit denen der Arbeitsalltag immer herzlich und kurzweilig verlief, vor allem an Simone, die mir das Operieren an den Mäusen beibrachte und mit der ich mich immer konstruktiv über unsere Forschungsergebnisse austauschen konnte, an Sophia, die mir das Genotypisieren und die histologischen Färbungen beibrachte, und an Kathrin für die Hilfe bei den Versuchsenden.

Danke auch an Kathrin Eidenschink und Brigitte Ruhland, in deren Laborräumen ich für die PCRs zu Gast sein durfte.

Und zuletzt noch ein Dank an meine Familie, die zwar nicht aktiv an dieser Arbeit teilhatte, mich aber mein Leben lang unterstützt hat und mir einen wichtigen Rückzugsort bietet, an dem ich auch mal an andere Dinge als die Arbeit denken kann. Ihr seid einfach die Besten.